

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Oftalmología y Otorrinolaringología



TESIS DOCTORAL

**Estudios de la sensibilidad a la neurotoxicidad en el receptor
auditivo durante el envejecimiento**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Bárbara Romero Gómez

Directores

Francisco Javier Carricondo Orejana
Joaquín Poch Broto

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Oftalmología y Otorrinolaringología
Laboratorio de Neurobiología de la Audición

Estudios de la sensibilidad a la neurotoxicidad en el receptor auditivo durante el envejecimiento

TESIS DOCTORAL
Bárbara Romero Gómez

Dirigida por :

Prof. Dr. Francisco Javier Carricondo Orejana
Prof. Dr. Joaquín Poch Broto

MADRID 2017



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Bárbara Romero Gómez
Título de la Tesis	ESTUDIOS DE LA SENSIBILIDAD A LA NEUROTOXICIDAD EN EL RECEPTOR AUDITIVO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO
Facultad o Centro	Facultad de Medicina

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	Francisco Javier Carricondo Orejana
Centro al que pertenece y dirección	Dpto. Oftalmología y Otorrinolaringología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid
D.N.I./Pasaporte	
e-mail	ffcarric@ucm.es

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad				
Definición Objetivos				
Metodología				
Relevancia Resultados				
Discusión / Conclusiones				

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El trabajo de Tesis Doctoral titulado: **ESTUDIOS DE LA SENSIBILIDAD A LA NEUROTOXICIDAD EN EL RECEPTOR AUDITIVO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO** presentado por D^a. Bárbara Romero Gómez, supone la continuación de dos líneas de investigación clásicas, los análisis de los efectos producidos por la neurotoxicidad asociada a la acumulación de glutamato en la sinapsis glutamatérgicas entre las células ciliadas internas del órgano de Corti y las neuronas aferentes de tipo I del ganglio espiral coclear, y por otro lado, los estudios de la sordera debida al envejecimiento del receptor auditivo, la presbiacusia. Supone un protocolo experimental utilizando un modelo animal habitual en los estudios de envejecimiento como es el ratón C57BL6J, en el que se ha podido observar que ambos procesos tienen mecanismos comunes. Así, a medida que el receptor auditivo envejece puede hacerse cada vez más sensible a patologías neurotóxicas, como procesos de hipoxia y/isquemia en el oído o como la exposición continua a sonidos de intensidad moderada. Metodológicamente, el trabajo está bien planteado con 5 grupos de edad, grupos control y tratamiento y el sexo del animal. Además, se hace un estudio de la influencia del ciclo estral en la sensibilidad durante la edad a la neurotoxicidad del glutamato. Los resultados obtenidos son prometedores y abre la puerta a futuras aproximaciones experimentales para acceder a llas diferentes vertientes que deja abiertas esta Tesis Doctoral.

Por todo ello, considero que dicho trabajo puede pasar a su defensa pública

Madrid, a 19 de abril de 2017

Fdo.: Francisco Javier Carricondo Orejana

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Bárbara Romero Gómez
Título de la Tesis	ESTUDIOS DE LA SENSIBILIDAD A LA NEUROTOXICIDAD EN EL RECEPTOR AUDITIVO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO
Facultad o Centro	Facultad de Medicina

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	Joaquín Poch Broto
Centro al que pertenece y dirección	Dpto. Oftalmología y Otorrinolaringología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid
D.N.I./Pasaporte	
e-mail	jpoch.hcsc@salud.madrid.org

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	✓			
Definición Objetivos	✓			
Metodología	✓			
Relevancia Resultados	✓			
Discusión / Conclusiones	✓			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El trabajo de Tesis Doctoral titulado: **ESTUDIOS DE LA SENSIBILIDAD A LA NEUROTOXICIDAD EN EL RECEPTOR AUDITIVO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO** presentado por D^a. Bárbara Romero Gómez, se ha realizado aunando la experiencia de nuestro laboratorio en los estudios básicos de la progresión de la sordera durante el envejecimiento, la presbiacusia, de un modelo animal experimental, el ratón C57BL6J, utilizado de manera habitual como modelo de envejecimiento. La propuesta de investigación de esta Tesis Doctoral se centra en el análisis del cambio de sensibilidad a la neurotoxicidad debida al glutamato en el órgano de Corti durante el envejecimiento teniendo también en cuenta el sexo del animal, así como la influencia del ciclo estral en la sensibilidad durante la edad a la neurotoxicidad del glutamato. La metodología está bien planteada llevando a cabo un estudio electrofisiológico de registro de los potenciales evocados auditivos de tronco cerebral, y un estudio morfológico posteriormente con identificación mediante técnicas de inmunocitoquímica de diferentes marcadores que pueden caracterizar el proceso de neurotoxicidad en los diferentes grupos experimentales, como la cascada de apoptosis, etc. Los resultados obtenidos no son concluyentes sino que abre la posibilidad de desarrollo de nuevas aproximaciones experimentales para continuar con el estudio de este modelo de envejecimiento.

Por todo ello, considero que dicho trabajo puede pasar a su defensa pública

Madrid, a 19 de abril de 2017

Fdo.: Joaquín Poch Broto

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la

“Libertas perfundet omnia luce”

Esta memoria de Tesis Doctoral ha sido financiada exclusivamente por el Laboratorio de Neurobiología de la Audición, el Departamento de ORL de la Universidad Complutense de Madrid y Milenio Gráfico S.L.

Muchas gracias a todos por vuestro apoyo incondicional.

Agradecimientos

Cuando comencé a colaborar en el Laboratorio de Neurobiología de la Audición, bajo la dirección del Profesor Pablo Gil-Loyzaga, no caí en la cuenta de que el primer paso para investigar es la curiosidad, esa curiosidad que todos tenemos de un modo u otro, que nos hace sentirnos como niños ante un nuevo descubrimiento, curiosidad que en mi caso mantenía aletargada, a la espera, y que gracias a mis maestros ha ido despertando cada vez más, día tras día en el laboratorio, en las clases con los alumnos, en los congresos, las exposiciones, las charlas de ciencia, y las de no-ciencia... y de... tantas cosas!

Pero de entre todos mis maestros, no puedo evitar destacar a tres, que me han dado la oportunidad para desarrollarme tanto profesional como personalmente y han sabido promover en mi ese despertar en la ciencia y la curiosidad que tanto necesitaba.

Quiero agradecer en primer lugar al Profesor Joaquín Poch Broto, Jefe de Servicio de ORL del Hospital Clínico San Carlos y Catedrático de Otorrinolaringología de la Universidad Complutense de Madrid, quien no solo como Director de esta Tesis, sino también como Director del Departamento de Oftalmología y Otorrinolaringología, me acogió como a uno más del equipo, en momentos muy difíciles para nosotros y que desde entonces ha marcado con su rigor mi camino de la investigación y la docencia en la Universidad. Recuerdo también con mucho cariño sus explicaciones en la exposición de D. Santiago Ramón y Cajal al hilo de la compra de su telescopio.... al final.... todos tenemos debilidades... Gracias Profesor.

En segundo lugar, quiero agradecerle al Profesor Francisco Javier Carricondo Orejana, que no solo ha sido mi tutor, si no que ha sido él, quien con mucha paciencia y cariño, ha sabido llevarme al camino de la investigación, mostrándome lo apasionante que puede ser la ciencia. Ha sabido transmitirme no solo lo que había detrás de esta puerta, si no de todas las que se abren si uno es capaz de preguntarse simplemente, qué hay al otro lado, y me ha hecho ver que en la vida existe todo un mundo de posibilidades para disfrutar si uno es capaz de verlas y apreciarlas. Gracias por darme esa llave maestra!

Y el último de los tres maestros al que quiero agradecer y dedicar esta Tesis Doctoral, es al Profesor Pablo Gil Loyzaga, Catedrático de Neurobiología de la Audición, al que seguimos echando de menos, y quien hubiera disfrutado muchísimo viéndola hacerse realidad y transmitiendo su legado por fin. Por eso, esta tesis va especialmente dedicada a él. Esta idea es suya, y esté donde esté, espero no haberle defraudado con este humilde trabajo de investigación. Por la oportunidad tan grande que me dio al acogerme en el laboratorio, por su confianza y su apoyo y por la razón que tenía al decirme que “me iba a encantar esto”, le estaré agradecida siempre.

Pero además tengo que darles las gracias a todas las personas que de un modo u otro me han ayudado y me han acompañado a lo largo de estos últimos años.

A Encarnación Muñoz le debo muchísimo y sin ella, este trabajo no hubiera sido, de ninguna manera, posible. De ella he aprendido todo tipo de técnicas de laboratorio y con ella he aprendido a manejar en él. Muchas gracias Encarna por tu inestimable ayuda en el laboratorio, tus técnicas morfológicas, tus enseñanzas y sobre todo por tu gran paciencia para conmigo... bien sabes que sin ti este trabajo no hubiera salido adelante.

A Marta, gracias por los ánimos, la comprensión, por estar tan pendiente de que todo vaya bien con tanto cariño y por esa alegría que transmites al laboratorio, y mucho ánimo a ti también, que creo que vas a ser una investigadora excepcional si te lo propones.

A todos mis compañeros del departamento de Oftalmología y Otorrinolaringología por haberme acogido como a una más desde el primer momento, haberse preocupado por mi, y haberme defendido en los momentos más complicados, siempre con una sonrisa por delante, muchas gracias a todos!

Quiero agradecerse también a mis padres, que pase lo que pase siempre son capaces de animarme a hacer cualquier cosa que me proponga, siendo la balanza sobre la que sopeso mis decisiones y sobre la que me apoyo en los momentos buenos y los no tan buenos. Gracias por estar ahí para todo, por apoyarme cómo lo hacéis y por vuestro esfuerzo y soporte tanto material como espiritual, que me ha permitido llevar a cabo este trabajo y todos los sueños que me he propuesto hasta ahora.

A Ernesto, por su paciencia, su apoyo en los momentos difíciles y su comprensión para todo lo que hago y lo que digo, que aunque suele ser bastante, en realidad, como él bien sabe, muchas veces sobran las palabras para decir lo que uno siente de verdad.

Me gustaría además, dedicarle esta tesis doctoral a toda la gente que alguna vez ha estado trabajando y colaborando en el laboratorio, la Cátedra de Neurobiología de la Audición. Durante estos 4 años he ido conociendo sus vidas, por medio de sus trabajos y me han hecho entender que la investigación, un mundo que desconocía, en ocasiones puede ser muy arduo, pero en otras, la recompensa es tan gratificante, que uno no puede evitar dar rienda suelta a la curiosidad y sentirse de nuevo tan emocionado como un niño, ante un descubrimiento.

En definitiva, creo que en estos cuatro últimos años, me he formado, no se si para ser una buena investigadora, pero si se han desarrollado en mi capacidades neoténicas que creía completamente olvidadas y que cada día disfruto más. Esa formación se la debo a mis maestros, compañeros y amigos, pero también a toda la gente que me ha acompañado durante este tiempo y de los cuales he aprendido muchísimas cosas de la cóclea y de lo que no era la cóclea, a todos ellos, estén aquí referenciados o no, les doy las gracias por haberse cruzado en mi camino.

Índice

ÍNDICE

RESUMEN	9
LISTA DE ABREVIATURAS	12
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. ANATOMÍA FUNCIONAL DEL SISTEMA AUDITIVO	18
1.1.1. El oído externo y el oído medio	19
1.1.2. El oído interno	20
a) El laberinto óseo y membranoso	20
b) La cóclea	21
c) Las linfas cocleares	21
d) Las rampas cocleares: La rampa central	23
e) El órgano de Corti	23
e.1) Las células de sorporte	23
- Células de los pilares del túnel de Corti	24
- Células de Deiters	24
e.2) Las células sensoriales	24
- Células Ciliadas Externas	25
- Células Ciliadas Internas	26
1.1.3. La fisiología del receptor auditivo: La mecánica coclear	26
a) Micromecánica colear pasiva y la tonotopía del receptor auditivo	26
b) Micromecánica colear activa. Mecanismos de activación del órgano de Corti y la transducción mecanoeléctrica	28
b.1) Activación de las CCEs	28
b.2) Activación de la CCI. La transducción mecanoeléctrica	29
1.1.4. La inervación del receptor auditivo: La vía auditiva	30
a) Inervación aferente del órgano de corti y las vías auditivas ascendentes	32
a.1) El ganglio espiral y el nervio auditivo	32
a.1.1) Neuronas aferentes de tipo I	32
- Activación de las fibras aferentes de tipo I	33
a.1.2) Neuronas aferentes de tipo II	33
a.2) Los núcleos cocleares	34
a.3) El complejo olivar superior	36
b) Inervación eferente del órgano de Corti y las vías auditivas descendentes	38
b.1) Fascículo olivocodear medial	38
b.2) Fascículo oferente lateral	38
c) Centros superiores de la vía auditiva	40

1.2. REGULACIÓN ENDÓGENA DEL SISTEMA AUDITIVO	41
1.2.1. Neurotransmisores excitadores de la vía auditiva aferente	41
a) Glutamato	41
1.2.2. Neurotransmisores inhibidores o moduladores de la vía auditiva eferente	41
a) Dopamina	42
b) GABA (ácido gamma-aminobutírico)	43
c) Serotonina	43
d) Acetilcolina (ACh)	43
e) Otras sustancias neuromoduladoras	44
1.2.3. Hormonas que modulan el sistema auditivo	44
a) Estrógenos	44
b) Progesterona	45
1.3. LA PATOLOGÍA AUDITIVA: LAS HIPOACUSIAS	47
1.3.1. Etiologías de las hipoacusias neurosensoriales	47
a) Trauma acústico y excitotoxicidad	47
b) Exposición a sustancias ototóxicas	50
c) Envejecimiento del sistema auditivo: La presbiacusia	50
c.1) Tipos de presbiacusia (formas anatomoclínicas)	51
c.2) Factores genéticos de la presbiacusia	53
c.3) Factores ambientales de la presbiacusia	55
c.4) Evolución y tratamiento de la presbiacusia	55
c.5) Etiopatogenia: Origen y mecanismos de la patología	56
d) Apoptosis	56
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
3. MATERIAL Y MÉTODOS	71
3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	71
3.2. GRUPOS EXPERIMENTALES. PROTOCOLO DE NEUROTOXICIDAD: ADMINISTRACIÓN DE GLUTAMATO MONOSÓDICO	71
3.3. PROCEDIMIENTOS ELECTROFISIOLÓGICOS: EL REGISTRO DEL POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO DE TRONCO CEREBRAL	72
3.3.1. Material de registro electrofisiológico	72
3.3.2. Método experimental y de registro de los potenciales evocados auditivos	73
3.3.3. Obtención de las medidas y procesamiento estadístico	73
3.4. DETERMINACIÓN DEL ESTADO DEL CICLO ESTRAL. PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE FROTIS VAGINALES	75
3.5. ESTUDIO MORFOLÓGICO E HISTOLÓGICO	76
3.5.1. Tratamiento de las muestras para histología	77
a) Tratamiento de las cócleas	77
b) Tratamiento del sistema nervioso central	77
3.5.2. Inmunohistoquímica	78

4. RESULTADOS	83
4.1. RESULTADOS DE ELECTROFISIOLOGÍA: PEATC	83
4.1.1. Estudio del Efecto factor de la Edad	84
4.1.2. Estudio del Efecto del factor Sexo	86
4.1.3. Estudio del Efecto del factor Tratamiento	90
4.1.4. Estudio de los Umbrales auditivos del PEATC	94
4.1.5. Estudio de evolución durante la edad	96
a) Efecto del sexo en la edad	96
b) Efecto del tratamiento en la edad	98
4.1.6. Estudio electrofisiológico en función del ciclo estral	100
a) Resultados del efecto de la edad	100
b) Resultados del efecto del sexo	106
c) Resultados del efecto del tratamiento	108
4.2. RESULTADOS MORFOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS	112
4.2.1. Resultados de las tinciones histológicas	112
a) Tinción de las cócleas con Hematoxilina-Eosina	112
b) Tinción del complejo olivar superior con violeta de Cresilo	122
4.2.2. Inmunohistoquímica	128
a) Detección inmunohistoquímica de caspasa 3	128
b) Detección inmunohistoquímica de caspasa 9	134
c) Detección inmunohistoquímica de caspasa 8	140
d) Detección inmunohistoquímica de Bax y Bcl-2	146
e) Detección inmunohistoquímica de enolasa neuronal específica (NSE)	156
f) Detección inmunohistoquímica de neurofilamentos 200kDa	162
5. DISCUSIÓN	169
5.1. ESTUDIO ELECTROFISIOLOGICO. REGISTRO DE POTENCIALES EVOCADOS AUDITIVOS DE TRONCO CEREBRAL	171
5.1.1. Estudio del efecto de la edad	171
5.1.2. Estudio del efecto del sexo	173
5.1.3. Estudio del efecto del tratamiento	174
5.1.4. Estudio de los umbrales	177
5.1.5. Estudio electrofisiológico en función del ciclo estral	177
5.1.6. Estudio electrofisiológico de la evolución de la edad	181
5.2. RESULTADOS MORFOLÓGICOS	182
5.2.1. Análisis del receptor auditivo. tinción de hematoxilina-eosina	182
5.2.2. Análisis del complejo olivar superior. Tinción de violeta de cresilo	185
5.2.3. Análisis de la expresión de diferentes marcadores en la cóclea mediante técnicas inmunohistoquímicas	187
a) Análisis de la detección inmunohistoquímica de Caspasa 3	190
b) Análisis de la detección inmunohistoquímica de Caspasa 9	191
c) Análisis de la detección inmunohistoquímica de Caspasa 8	192
d) Análisis de la detección inmunohistoquímica de Bax-Bcl-2	194
e) Análisis de la detección inmunohistoquímica de enolasa neuronal específica (NSE)	196
f) Análisis de la detección inmunohistoquímica de neurofilamentos 200kDa	197
6. CONCLUSIONES	203
7. BIBLIOGRAFÍA	207

Resumen

Resumen

La presbiacusia o sordera debida al envejecimiento es una de las patologías más prevalentes en las personas mayores y que tiene graves consecuencias en la comunicación. Su etiología es variada, produciendo alteraciones en diferentes elementos del órgano de Corti. En ciertas condiciones patológicas, como el trauma acústico o la hipoxia o isquemia en la cóclea, se observan edemas dendríticos de las fibras aferentes de tipo-I del ganglio espiral y la consecuente pérdida de elementos activos en el VIII par debido la acumulación excesiva del neurotransmisor glutamato en la sinapsis. Este tipo de patología neural, podría estar relacionada con el inicio de la presbiacusia por lo que se propone el análisis de la sensibilidad neuronal a la neurotoxicidad debida al glutamato a lo largo de la edad, de las diferencias sexuales y de la influencia de la fase del ciclo estral en esta sensibilidad a la neurotoxicidad debida al glutamato, en un modelo animal experimental, el ratón C57BL6J, utilizado de manera habitual como modelo de envejecimiento. Se llevaron a cabo estudios electrofisiológicos de registro de potenciales evocados auditivos de tronco cerebral y estudios morfológicos con tinciones simples e identificación, mediante técnicas de inmunohistoquímica, de diferentes marcadores que pueden caracterizar el proceso de neurotoxicidad en los diferentes grupos experimentales, como la cascada de apoptosis, etc. Los resultados obtenidos no son concluyentes sino que abre la posibilidad de desarrollo de nuevas aproximaciones experimentales para continuar con el estudio de este modelo de envejecimiento.

Palabras clave: envejecimiento, audición, cóclea, excitotoxicidad, estrógenos, ciclo estral, electrofisiología, inmunohistoquímica

Abstract

The aging related deafness also called presbycusis is one of the most prevalent pathologies of the elder people and it could have an impact on their communication capabilities. The ethiology is varied, producing alterations in some elements of the organ of Corti. In certain pathological conditions, such as the acoustic trauma or hypoxic/ischaemia, some dendritic damage could be detected in the cochlear afferent type-I nerve fibers of the cochlear spiral ganglion that could lead to the death of the neuron. If this condition continues in time, a consequent loss of active elements of the VIII nerve due to an uncontrolled accumulation of the neurotransmitter glutamate in the sinapsis. This kind of neural pathology could be related with the presbycusis onset so the analysis of neurotoxic process induced by glutamate is hereby proposed to be carried out along the age, between gender and taking in mind the female estral phase influence on the glutamate neurotoxicity in an experimental animal model, the C57BL6J mouse, commonly used in this kind of aging studies. Electrophysiological studies of brain stem auditory evoked potentials and morphological studies with simple staining methods and identification by immunohistochemical techniques of different markers that can characterize the neurotoxicity process in the different experimental groups, such as the apoptosis cascade, etc. were carried out. The results obtained are not conclusive but opens the possibility of developing new experimental approaches to continue the study of this model of aging.

Keywords: aging, hearing, cochlea, excitotoxicity, estrogens, estral cycle, electrophysiology, immunohistochemistry

Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ach: Acetilcolina
- ADN: Ácido Dexosirribonucleico
- AK: Ácido Kaínico
- AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
- ARHL: Age-related hearing loss
- ATP: Adenosin Trifosfato
- CAE: Conducto Auditivo Interno
- CC: Célula Ciliada
- CCE: Célula Ciliada Externa
- CCI: Célula Ciliada Interna
- CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina
- COS: Complejo Olivar Superior
- dB: decibelio
- FOCL: Fascículo Olivo Coclear Lateral
- FOCL: Fascículo Olivo Coclear Lateral
- GABA: ácido gamma-aminobutírico
- GAD: Glutamato descarboxilasa
- GLU: Glutamato
- GMS: Glutamato Monosódico
- HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

- Hz: Hercios
- LH: Hormona Luteinizante
- NCD: Núcleo Coclear Dorsal
- NCAV: Núcleo Coclear Antero-Ventral
- NCPV: Núcleo Coclear Póster-Ventral
- NCV: Núcleo Coclear Ventral
- NMDA: N-metil-D-aspartato
- ROS: especies reactivas al oxígeno
- RE: Retículo endoplasmico
- SNC: Sistema Nervioso Central
- TH: Tirosina Hidroxilas

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores logros de la humanidad producido durante el siglo XX es el aumento de la esperanza de vida, que se ha visto incluso duplicada en algunos países, como consecuencia de los avances en medicina y la mejora de la calidad de vida. Por ejemplo en España, se ha pasado de una esperanza de vida de 34,8 años en el año 1900, a una de 82,71 años en 2015, en promedio entre ambos sexos. Las mujeres españolas tienen una esperanza de vida al nacer de 85,42 años, mientras que en los hombres es de 79,93 años, según estudios de 2015 ([Datos del INE 2015](#)).

Sin embargo, uno de los principales problemas que debemos afrontar en las primeras décadas del nuevo siglo es que ese aumento de la esperanza de vida, conlleva un envejecimiento poblacional. Desarrollándose poblaciones cada vez más mayores, que presentan cada vez más patologías asociadas al envejecimiento pero que pretenden mantenerse sanas y con una buena calidad de vida el mayor tiempo posible. Esto genera una población cada vez más envejecida con un buen nivel de salud y actividad. El proceso de envejecimiento no es en sí una enfermedad, sino un proceso fisiológico global en el que intervienen multitud de factores genéticos y ambientales, por lo que no es uniforme y afecta a cada persona de diferente modo ([Ciges et al., 1999](#)). El mantenimiento de una buena actividad funcional depende en gran medida del sistema nervioso central (SNC), que evita el envejecimiento global del individuo. ([Gil-Loyzaga y Carricondo, 2013](#)).

Dentro de las patologías neurodegenerativas asociadas al envejecimiento se incluyen las que afectan a los sistemas sensoriales, entre las cuales se encuentra la sordera neurosensorial asociada a la edad, denominada en clínica humana como presbiacusia. La presbiacusia se define como una pérdida auditiva asociada a la edad que suele ser de carácter bilateral, casi siempre simétrica, y que combina efectos centrales y periféricos, generando dificultades en el procesamiento del sonido y en el lenguaje ([Schuknecht y Gacek, 1993](#); [Gil-Loyzaga y Carricondo, 2013](#)).

La audición es uno de los sentidos que nos relaciona con nuestro entorno. Desde los comienzos de la humanidad nos ha proporcionado defensa y supervivencia en la naturaleza y aunque muchas veces pasa desapercibido, ha tenido un papel fundamental en la evolución humana. Los mamíferos son animales con un alto grado de interacción social que requieren sistemas de comunicación muy elaborados, pero el ser humano, gracias a su receptor auditivo, ha sido capaz de aumentar la complejidad y

capacidad de comunicarse con sus semejantes, constituyendo el lenguaje. Para las personas es imprescindible por tanto mantener un sistema que les permita comprender el lenguaje correctamente y por ello cualquier defecto en la audición va a provocar un problema en la interacción social del individuo.

1.1. ANATOMÍA FUNCIONAL DEL SISTEMA AUDITIVO

El sistema auditivo de los mamíferos está compuesto por dos estructuras, una periférica con función sensorial, el receptor auditivo, y una central, cuyo objeto es el procesamiento de la información que llega a través del receptor, la vía auditiva del SNC (Fig.1).

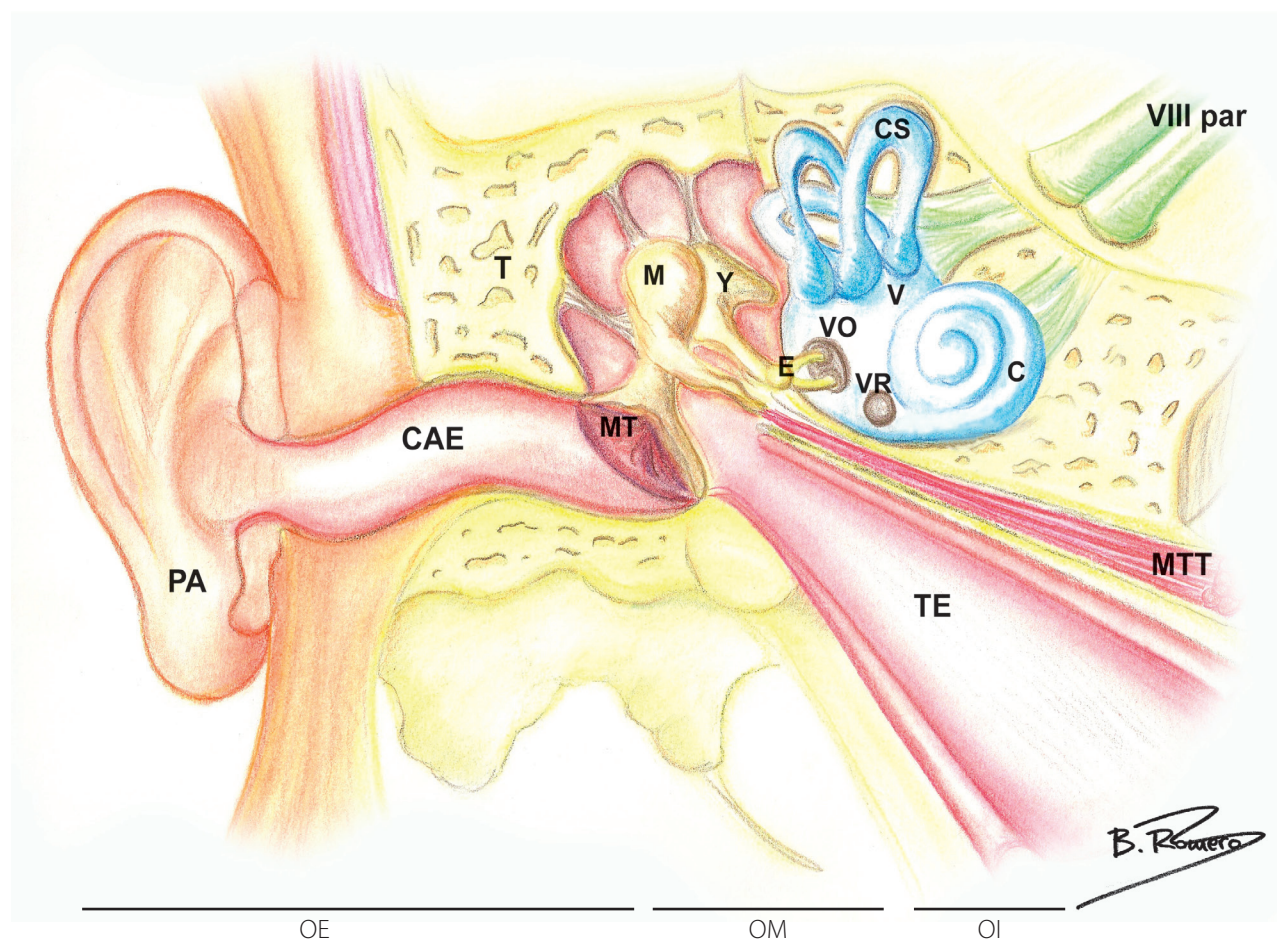


Figura 1: Esquema anatómico del receptor auditivo: Oído externo (OE), oído medio (OM) y oído interno (OI). Cuando la onda sonora llega al receptor auditivo, entra por el pabellón auditivo (PA), pasa por el conducto auditivo externo (CAE), hasta llegar a la membrana timpánica (MT), cuya vibración se transmite desde la cadena de huesecillos, Martillo (M), Yunque (Y) y Estribo (E), a la membrana oval, que al vibrar, movilizará la perilinfa de la cóclea (C) dilatando la membrana redonda (MR). CS, canales semicirculares; MTT, músculo tensor del tímpano; T, hueso temporal; TE, trompa de Eustaquio; V, vestíbulo; VIII par, Nervio estatoacústico; VO, ventana oval; VR, ventana redonda.

1.1.1. El oído externo y el oído medio.

El sonido se transmite por vibraciones moleculares que se producen en un medio. A lo largo de la evolución el medio de transmisión del sonido ha pasado de ser acuático en los peces, a aéreo en los mamíferos terrestres y ha sido necesaria una modificación de las estructuras para poder transmitir esa vibración desde el aire, hasta un medio líquido más denso, en el que está inmerso el receptor auditivo. El medio líquido implica más masa y, por lo tanto, mayor inercia al movimiento, es decir, mayor resistencia o impedancia al paso de las vibraciones (Gil-Loyzaga et al., 2005; Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007a; 2007b; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010; Carricondo et al., 2014). Además, las ondas sonoras transmitidas por el aire portan muy poca energía, insuficiente para movilizar los líquidos endococleares directamente. Por lo tanto, en los mamíferos todo el sistema auditivo externo y medio (Fig.1), tiene la finalidad de aumentar la energía de esa vibración del medio aéreo para poder transmitir la vibración al oído interno y activar el órgano de Corti (Carricondo et al., 2014).

Así, la onda de presión del aire, que transporta la información de la perturbación que la creó, será recogida por el pabellón auditivo que, con funciones de antena acústica, concentra la onda sonora en el meato auditivo externo, para que entre en el conducto auditivo externo (CAE), y llegue a la membrana timpánica (Fig.1), a la que hace vibrar a la frecuencia del sonido estimulante (Carricondo et al., 2014), que en el caso de la audición humana, estará en el rango audible, entre los 20 y los 20000Hz (Gil-Loyzaga et al., 2005; Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007a; 2007b; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010). Esta vibración se transmitirá al oído medio, cuya cavidad aérea, la caja timpánica, contiene la cadena de huesecillos: el Martillo, inserto en la membrana timpánica, Yunque y Estribo, este último unido por el ligamento de Rudinger a la membrana oval, que tapiza la ventana oval coclear (Fig.1). Cuando la membrana timpánica vibra con el sonido estimulante, se transmitirá la vibración a la misma frecuencia por la cadena de huesecillos hasta la membrana oval que al vibrar, movilizará las linfas cocleares. El estribo, de esta manera, empuja la membrana oval para ejercer un movimiento vibratorio en la perilinfa coclear. Esto solo es posible, dado que es un medio líquido y no puede comprimirse, gracias a la presencia de la membrana redonda, que tapizando la ventana redonda coclear, acompasará su movimiento con cada vibración de la membrana oval (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007b) (Fig.1).

Así, la transformación de la onda sonora en vibración mecánica por parte del tímpano y la cadena de huesecillos facilita la movilización de los líquidos endococleares (Carricondo et al., 2014) adaptando la impedancia entre el medio aéreo y el medio líquido coclear, posibilitando el paso de la vibración a la perilinfa que permitirá la formación de la onda viajera en la membrana basilar del órgano de Corti (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007b).

1.1.2. El oído interno.

a) El laberinto óseo y membranoso

El oído interno se encuentra situado en una serie de cavidades excavadas en el interior del peñasco del hueso temporal. Está formado por dos estructuras: el laberinto óseo, en su parte más externa y en cuyo interior contiene el laberinto membranoso, una estructura interna delimitada por membranas sobre la que se sustentan dos receptores sensoriales, el receptor del equilibrio y el receptor auditivo. En la parte más posterior del laberinto se sitúa el receptor del equilibrio: el vestíbulo y los canales semicirculares, mientras que el receptor auditivo se

sitúa en el laberinto anterior, en una estructura específica de los mamíferos denominada cóclea (Fig. 2a) (Gil-Loyzaga y Pujol, 2010; Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007a; Gil-Carcedo, 2011).

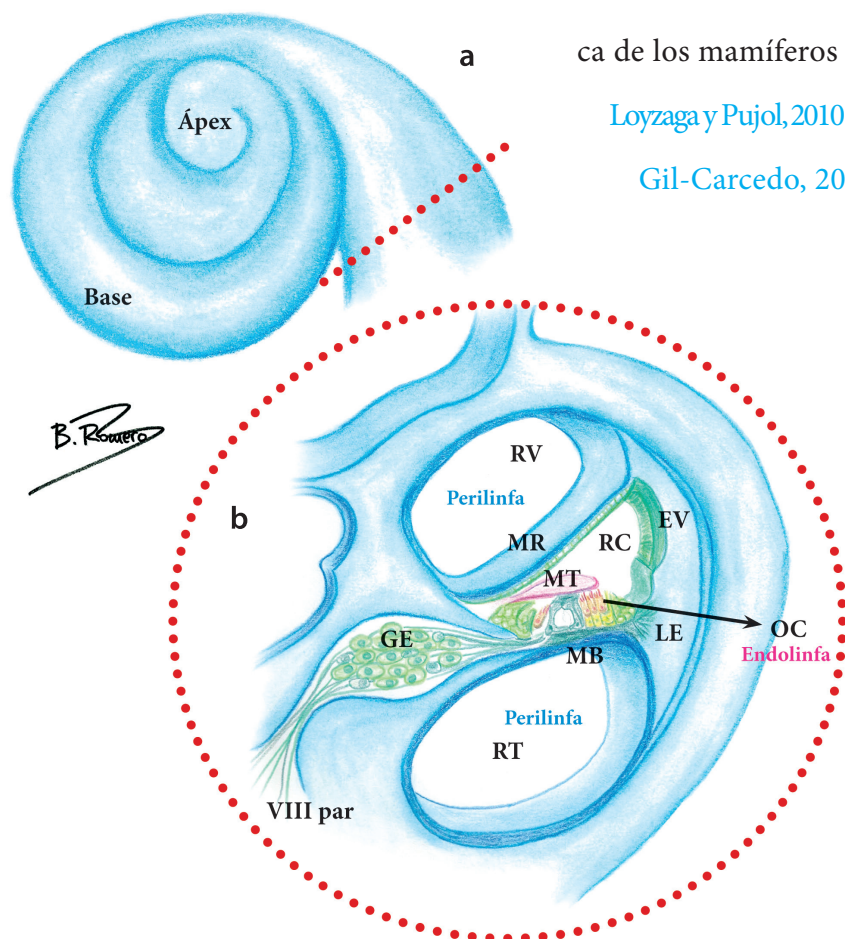


Figura 2: Receptor auditivo interno: La Cóclea

a: Esquema general de la Cóclea. b: Corte transversal de la espira basal coclear; EV, estría vascular; GE, ganglio espiral; LE, ligamento espiral; RC, rampa coclear; RT, rampa timpánica; RV, rampa vestibular; MB, membrana basilar; MR, membrana de Reissner; MT, membrana tectoria; OC, órgano de Corti.

b) La cóclea

La cóclea es un tubo arrollado en espiral alrededor de un eje óseo cónico central que se denomina modiolos. Presenta dos orificios, en su pared más externa, por medio de los cuales se relaciona con la cavidad del oído medio. Estos dos orificios, la ventana oval y la ventana redonda, están a su vez tapizados por dos membranas: la membrana oval, que se encuentra unida a la platina del estribo por medio del ligamento de Rudinger y la membrana redonda, que cierra la ventana del mismo nombre y se encuentra libre (Fig.1). Tal y como se ha explicado antes, el acompasamiento en la vibración de ambas membranas permite el paso de la vibración sonora al interior de la cóclea. Es imprescindible que la membrana redonda se encuentre libre para que pueda producirse la audición, así compensa la presión ejercida por la cadena de huesecillos sobre la membrana oval y sobre el líquido coclear, permitiendo la vibración del mismo, ya que al tratarse de un líquido, no se comprime, y no se produciría la transmisión mecánica de la onda sonora al interior del receptor (Gil-Loyzaga et al., 2005; Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007a; 2007b; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010).

c) Las linfas cocleares

El oído interno contiene dos líquidos diferentes en los laberintos de la cóclea. El laberinto óseo contiene perilinfa cuya composición es similar a la de los líquidos extracelulares del organismo, rico en Na^+ pero bajo en K^+ (Na^+ : 140-150 mEq/L, K^+ : 3.5-7 mEq/L, Cl^- : 110 mEq/L y proteínas: 1-1.5 mEq/L), mientras que el laberinto membranoso está relleno de endolinfa, cuya composición química es muy peculiar, (Na^+ : 1-5 mEq/L, K^+ : 110-145 mEq/L, Cl^- : 130 mEq/L y proteínas: 0.3-0.6 mEq/L) siendo similar a la de un líquido intracelular, rica en K^+ pero poco concentrada en Na^+ (Fig.2). La diferencia de composición bioquímica entre ambos líquidos establece una diferencia de potencial entre las rampas cocleares denominada potencial endococlear, de unos 100-120 mV, que es necesaria para la activación electrofisiológica de las células sensoriales del órgano de Corti y el correcto funcionamiento del receptor auditivo (Gil-Loyzaga y Pujol, 2010).

d) Las rampas cocleares: La rampa central

El laberinto membranoso divide al conducto coclear en tres secciones, que se denominan rampas: vestibular, central o coclear y timpánica (Fig.2). Las rampas quedan delimitadas por

la membrana de Reissner, que separa la rampa vestibular de la central, y la membrana basilar, que separa la rampa central de la timpánica. Las rampas vestibular y timpánica están rellenas de perilinfa y se comunican por el helicotrema, un pequeño orificio situado en la zona del ápex coclear, la parte más apical del conducto coclear (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007a; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010).

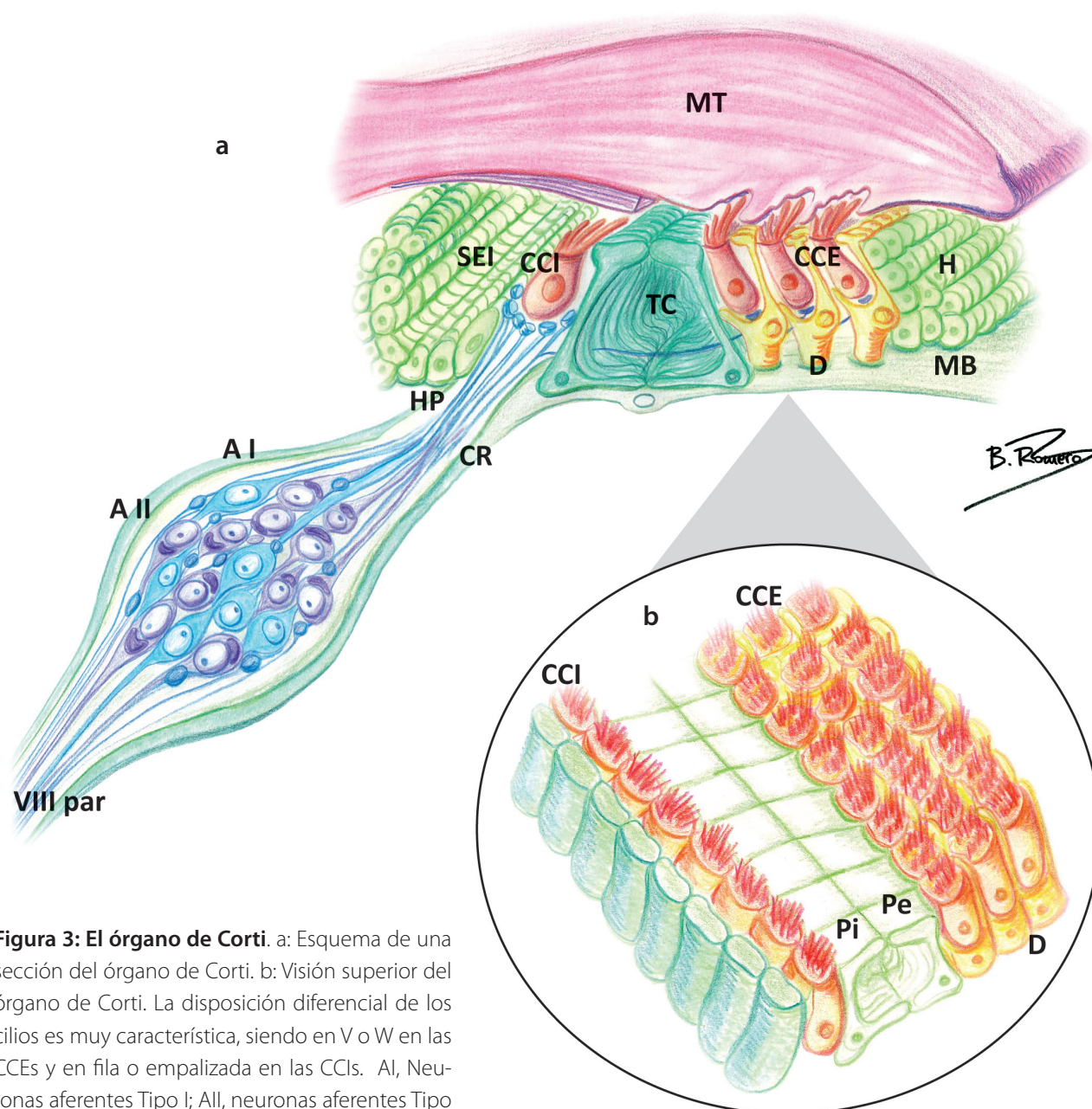


Figura 3: El órgano de Corti. a: Esquema de una sección del órgano de Corti. b: Visión superior del órgano de Corti. La disposición diferencial de los cilios es muy característica, siendo en V o W en las CCEs y en fila o empalizada en las CCIs. AI, Neuronas aferentes Tipo I; AII, neuronas aferentes Tipo II; CCE, célula ciliada externa; CCI, célula ciliada interna; CR, Canal de Rosenthal; D, células de Deiters; HP, Habenua Perforada; H, células de Hensen; Pe, Célula Pilar Externa; Pi, Célula Pilar Interna; MB, Membrana basilar; MT, Membrana tectoria; SEI, Surco Espiral Interno; TC, Túnel de Corti.

La rampa central o coclear (Fig.2), rellena de endolinfa, está limitada por la estría vascular en la pared más exterior y superior, la membrana de Reissner y la membrana basilar, en la que se sitúa el órgano de Corti (Fig.2 y 3). La estría vascular es un epitelio vascularizado, estratificado, carente de membrana basal, lo cual lo diferencia claramente de otros epitelios del organismo, y que presenta tres tipos de células: células basales, intermedias y marginales, estas últimas responsables del transporte de K^+ y su secreción a la endolinfa para el mantenimiento de su composición bioquímica (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007a; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010).

e) El órgano de Corti

El órgano de Corti (Fig.3), descrito por el anatomista italiano Alfonso de Corti (1822-1876) en 1851, es la principal estructura del receptor auditivo de los mamíferos, ya que en él se localizan las células sensoriales auditivas. Es un epitelio neurosensorial situado sobre la membrana basilar y formado por dos tipos celulares: células de soporte y células sensoriales sobre las que se asienta sobre la membrana tectoria (Fig.3). La membrana tectoria es una membrana acelular, de estructura fibrilar delimitada, compuesta por colágeno, glicoproteínas y glicosaminoglicanos (Gil-Loyzaga, 1997a). Constituye además un reservorio de K^+ , que aumentará la eficacia de la activación y la transducción mecanoeléctrica producida por las células sensoriales (Gil-Loyzaga, 1997a), y más específicamente de las células ciliadas externas, cuyos cilios se anclan en su parte más distal.

e.1) Las células de soporte

Existen varios tipos de células de soporte en el órgano de Corti (Fig .3.) Estas células permiten el mantenimiento de la estructura del receptor, que puede estar sometido a deformaciones de índole muy variable y que dependen de la intensidad y la frecuencia de la onda sonora estimulante.

Destacan dos tipos de células muy especializadas:

- Células de los pilares del túnel de Corti

Se sitúan sobre la membrana basilar, en la zona central del receptor, entre las células sensoriales y se disponen en dos hileras, pilar interno y pilar externo, delimitando el espacio interno de sección triangular, el Túnel de Corti (Fig.3), que divide al receptor en dos,

la parte interna, más cercana al modiollo y la externa, hacia la estría vascular. Son células muy especializadas, con un citoesqueleto muy desarrollado que les permite mantener ese túnel de sección triangular, y que da estabilidad estructural al receptor auditivo (Fig.3) (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007a; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010).

- Células de Deiters

Son otras células con características muy peculiares. Se encuentran sobre la membrana basilar y presentan también un citoesqueleto muy desarrollado, pero con la forma adecuada para alojar en su interior a una célula ciliada externa (CCE), a la que da soporte (Fig.3). Poseen una prolongación muy fina, el proceso falángico, que junto con la placa apical de las CCEs, aísla la zona superior del órgano de Corti, la rampa central, que contiene endolinfa, de la perilinfa en la que están bañados los somas de las células sensoriales, permitiendo que se establezca la diferencia de potencial entre los cilios de la parte más apical de la célula y el soma. Esta diferencia de potencial es imprescindible para que se produzca la activación de las células sensoriales (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007a; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010).

e.2) Las células sensoriales

Las células sensoriales, localizadas habitualmente en agrupaciones especializadas denominadas receptores sensoriales (Fig.3), captan las señales físico-químicas, tanto del medio interno como del ambiente que les rodea, y son capaces de transducir la información de esa señal a información bioeléctrica que estimule al SNC (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007b; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010).

Las células sensoriales del receptor auditivo son las células ciliadas (Fig.3), mecanorreceptores que detectan señales mecánicas de movimiento, y las transducen a señal eléctrica, a lenguaje neural (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007b; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010; Carricondo et al., 2014). En su porción más apical, en la placa cuticular, las células ciliadas poseen un penacho de estereocilios (Fig.3b) con un complejo citoesqueleto de filamentos de actina, unidos por puentes fibrilares glicoproteicos. Estos puentes permiten su movimiento conjunto cuando se produce la activación de la célula.

En cuanto a su morfología y fisiología, podemos dividir a las células ciliadas del receptor auditivo en dos tipos, internas y externas, según su posición anatómica respecto al túnel de Corti (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007a; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010).

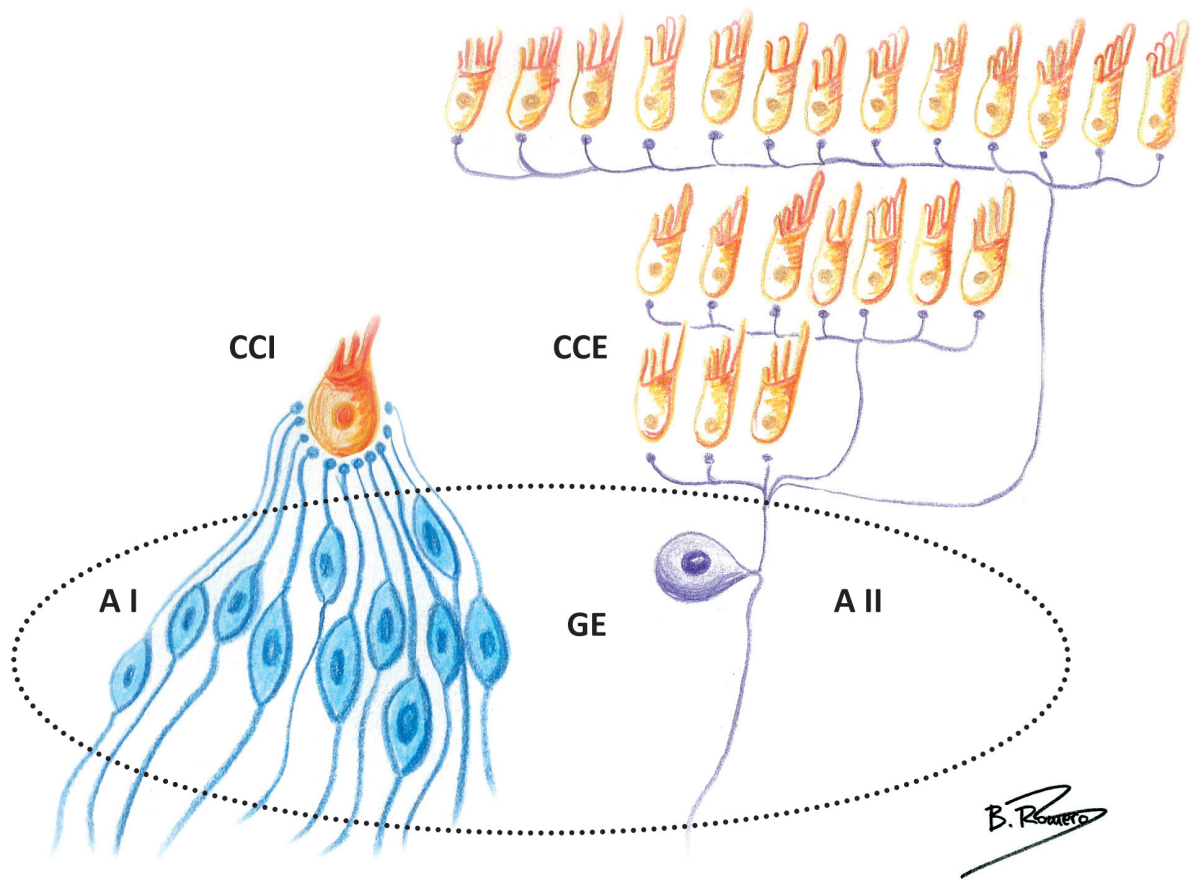


Figura 4: Esquema de inervación de las CCI y CCE por las neuronas del ganglio espiral. AI, neuronas aferentes Tipo I; AII, neuronas aferentes Tipo II; CCE, célula ciliada externa; CCI, célula ciliada interna. La zona punteada corresponde a los cuerpos neuronales, situados en el interior del ganglio espiral, GE.

- Las células ciliadas externas

Las células ciliadas externas (CCE) están situadas en el lado externo del túnel de Corti, sobre las células de Deiters que se encuentran en la membrana basilar, dispuestas en tres hileras a lo largo de toda la espira coclear (Fig.3). Tienen forma de cilindro con el núcleo situado en su polo basal y una hilera de estereocilios dispuestos en forma de V o W en su parte más apical (Fig.3b). Los estereocilios más altos se encuentran en la parte más externa del receptor y están anclados a la membrana tectoria.

Son células muy especializadas, que presentan en el interior de la membrana plasmática un sistema de cisternas lamelares, asociadas a una red de proteínas contráctiles como la actina, la espectrina y la prestina, que con la energía obtenida de las numerosas mitocondrias de la célula (Rovasio y Gil-Loyzaga, 2008) mantienen las propiedades contráctiles necesarias para amplificar el estímulo auditivo.

En su polo basal establecen contactos sinápticos con las dendritas de las neuronas tipo II del ganglio espiral y con los axones de las neuronas del fascículo eferente medial del complejo olivar superior (Fig.3y4) (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007a; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010).

- Las células ciliadas internas

Las células ciliadas internas (CCI) son las verdaderas responsables de la transducción mecanoeléctrica en el órgano de Corti (Fig.3). Los seres humanos tenemos unas 3.500 distribuidas de forma tonotópica, es decir, ordenadas según su frecuencia de codificación, situadas en una hilera al lado de la célula pilar interna del túnel de Corti, a lo largo de la espira coclear. Tienen un aspecto piriforme con el núcleo en posición central y 3-4 hileras de estereocilios libres y dispuestos en empalizada en su parte más apical. En su polo basal presentan entre 10-20 contactos sinápticos con los terminales dendríticos de las neuronas aferentes tipo I del ganglio espiral coclear (Fig.4) (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007a; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010).

1.1.3. La fisiología del receptor auditivo: La mecánica coclear

Tal y como se ha indicado en el apartado 1.1, para poder movilizar los líquidos endococleares con la energía adecuada, intervienen el tímpano y la cadena de huesecillos del oído medio que, vibrando a la misma frecuencia estimulante, transforman la vibración molecular del aire, captada por la membrana timpánica, en vibración mecánica que se transmitirá a la membrana oval de la cóclea. De esta manera, la vibración se transmite a la perilinfa y a la membrana basilar coclear, que generará una onda de vibración de la misma frecuencia que el sonido estimulante y que se situará en un lugar específico de la espiral coclear.

a) Micromecánica coclear pasiva y la tonotopía del receptor auditivo

Históricamente, se han ido proponiendo modelos para correlacionar la anatomía del receptor auditivo con su función (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007b; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010) y poder entender cómo se producía la codificación del sonido tanto en frecuencia como en intensidad.

El médico y físico alemán, Hermann von Helmholtz (1821-1894) propuso un modelo físico de resonadores para convertir al receptor auditivo en un analizador de frecuencias y elaboró su teoría de la resonancia (Helmholtz, 1895). Esta teoría proponía que las frecuencias que com-

ponían un sonido complejo, la frecuencia fundamental y sus armónicos, podrían codificarse independientemente en un lugar específico del receptor auditivo, comportándose como si de las teclas de un piano se tratara ([Carricondo et al., 2014](#)). Hoy desechada, la teoría resonante supuso la base para entender que a lo largo de toda la espiral coclear había una especificidad frecuencial para el análisis del sonido estimulante en lugares específicos del receptor, que en la actualidad se denomina tonotopía coclear ([Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007b](#); [Gil-Loyzaga y Pujol, 2010](#)).

Las frecuencias audibles para los seres humanos van desde los 20 a los 20.000 Hz. Este rango de frecuencias se distribuye de manera específica a lo largo de toda la membrana basilar de la cóclea, de manera que las más graves se sitúan en las zonas más apicales, mientras que las basales se corresponderán con las frecuencias más altas, cercanas a los 20.000 Hz.

Además, la tonotopía coclear se correlaciona con las diferencias existentes a nivel morfológico en varias de las estructuras a lo largo de las espiras del receptor. En la zona más apical la membrana basilar es ancha y muy fina, mientras que en la base de la cóclea la membrana basilar es estrecha y gruesa, lo que garantiza su resistencia a movimientos vibracionales muy rápidos, producidos por las altas frecuencias de activación que esta zona debe soportar. También hay diferencias morfológicas respecto al tamaño de las CCEs del órgano de Corti, más pequeñas y con cilios más cortos en la base coclear y sin embargo, más alargadas, con los cilios más largos en la zona apical ([Pujol et al., 1992](#)).

Un siglo más tarde, en 1961, el Premio Nobel de Fisiología y Medicina, Georg von Békésy (1899-1972), propuso un nuevo modelo de análisis frecuencial coclear que proporcionaba una explicación más detallada para el fenómeno de la tonotopía coclear. Von Békésy estudió los movimientos de la membrana basilar en cócleas humanas procedentes de cadáveres utilizando luz estroboscópica. En ellos observó que un sonido de una frecuencia determinada generaba una “onda viajera” en la membrana basilar, que tenía un máximo desplazamiento en un lugar concreto de la espiral coclear, la cual, se correspondía con la tonotopía esperada, predicha anteriormente por von Helmholtz, para la frecuencia del sonido estimulante ([Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007b](#); [Gil-Loyzaga y Pujol, 2010](#)).

Estas teorías explican lo que ocurriría de forma pasiva en la cóclea con la llegada de un sonido, pero solo a altas intensidades de estimulación, mientras que la audición a medias/bajas

intensidades requiere de otros mecanismos, que amplifiquen la señal y permitan la activación de las CCI's pese a una baja intensidad del sonido estimulante (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007b; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010).

b) Micromecánica coclear activa. Mecanismos de activación del órgano de Corti y la transducción mecanoeléctrica.

Los mecanismos activos cocleares suceden en tres procesos que se producen de forma correlativa y casi simultánea tras la transmisión de la vibración sonora a la membrana basilar, la cual vibraría en el lugar adecuado para cada frecuencia de sonido estimulante: la activación de las CCEs, la activación de la CCI y la transducción mecanoeléctrica y la activación de las fibras aferentes de tipo I del nervio auditivo.

b.1) Activación de las CCEs:

Las CCEs se encuentran por su polo basal fijadas a las células de Deiters y éstas a la membrana basilar, mientras que por su polo apical están unidas por la placa cuticular a la superficie del órgano de Corti y sus cilios se presentan anclados a la membrana tectoria. Esta situación las lleva a vibrar junto con la membrana basilar, con la llegada de la onda viajera tras la estimulación sonora. En el punto de máxima excursión de la membrana basilar, que codifica a la frecuencia de estimulación, los cilios de las CCE se deflexionan, ejerciendo presión sobre la membrana tectoria que libera, como si de una esponja se tratara, iones K^+ de la endolinfa (Gil-Loyzaga, 1997a). Se producirá así la primera activación micromecánica de las células sensoriales del receptor auditivo.

El cuerpo de la CCE está bañado en perilinfa, (rica en iones Na^+), mientras que su parte apical, se encuentra embebida en endolinfa (rica en iones K^+). Esta diferencia de composición iónica, generará una diferencia de potencial entre los polos superior e inferior de la célula, de manera que, cuando se produce la deflexión de los cilios, sus canales iónicos se abren dejando entrar iones K^+ en la célula, sufrirá una despolarización a lo largo de toda la membrana. Esta onda de despolarización activará canales voltaje-dependientes de Ca^{2+} , permitiendo la entrada de Ca^{2+} al interior celular que, a su vez, activará las proteínas contráctiles, como la prestina, y producirá su contracción. Los canales se cerrarán cuando los cilios sean flexionados por la membrana tectoria en sentido contrario, hacia el interior de la espiral

coclear, produciendo la hiperpolarización de la célula, mientras se recupera el equilibrio iónico, previo a la consecución del estado de reposo necesario para una nueva despolarización. La despolarización de la CCE conlleva la liberación por su polo basal del neurotransmisor que produce la activación de la neurona aferente de tipo II que la inerva (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007b; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010; Carricondo et al., 2014).

Con cada activación, la CCE se contrae, poniendo en contacto a la CCI con la membrana tectoria y dado que la membrana basilar vibrará a la misma frecuencia que el sonido estimulante, también lo harán las CCEs y, a su vez, las CCIs, siguiendo este patrón de activación y desactivación a la misma frecuencia que el sonido estimulante (Carricondo et al., 2014).

b.2) Activación de la CCI. La transducción mecanoeléctrica:

La activación de la CCI es el proceso clave para que se produzca la activación del sistema auditivo y la percepción de la sensación auditiva. Se inicia al activarse la CCE, que se contrae y acerca la membrana tectoria, para ponerla en contacto con los cilios de las CCI. Los cilios de las CCI, en ausencia de estímulo sonoro, se mantienen de forma libre bañados en la endolinfa, mientras que, como en el caso de las CCE, el cuerpo celular permanece en perilinfa. La diferencia de concentración iónica entre los dos líquidos cocleares y por tanto, la existencia del potencial endococlear, permitirá la despolarización de las CCIs y su activación. Como en el caso de las CCEs, los estereocilios de la CCI se deflexionan, abriendo sus canales iónicos, que permitirán la entrada de iones K^+ a la célula, más abundante en la endolinfa y que producirá su consiguiente activación por despolarización. La despolarización de la membrana, inicia la activación de las proteínas sinápticas del polo basal de la CCI, que determinan la exocitosis y liberación del neurotransmisor a la sinapsis con las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral. Estos mecanismos producen la transformación de la información de vibración mecánica a información eléctrica neural: la transducción mecanoeléctrica (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007b; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010).

El neurotransmisor principal de la sinapsis entre la CCI y la primera neurona de la vía auditiva, la neurona tipo I del ganglio espiral, es el glutamato (GLU), que ha sido también identificado como principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso. Las características de la sinapsis glutamatérgica la hacen apropiada para estas vías activadoras, aunque una

excesiva activación pueda inducir un proceso neurotóxico específico denominado excitotoxicidad (Carricondo, 2000).

Las CCIs tras su activación liberan a la hendidura sináptica GLU, que activa a las fibras aferentes de las neuronas tipo I del ganglio espiral, actuando sobre sus receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA y no-NMDA (Davis, 1983; Gil-Loyzaga, 1999).

Como la activación de las células ciliadas sigue un ciclo que coincide en frecuencia con el movimiento de la membrana basilar y, a su vez, con la frecuencia del sonido estimulante, la liberación del GLU y la activación de las fibras aferentes de tipo I seguirán el mismo patrón de frecuencia del sonido estimulante. La amplitud del sonido quedará codificada en función del número de neuronas que se activen, siendo proporcional el aumento de neuronas activas en el ganglio espiral con el aumento de la intensidad del estímulo auditivo. De esta manera, en la transducción mecanoeléctrica se codificarán las características del sonido estimulante para enviarlas al SNC (Gil-Loyzaga, 2005).

1.1.4. La inervación del receptor auditivo: La vía auditiva

Para que el sistema auditivo lleve a cabo su función completa, es necesario que además de un receptor auditivo que capte y codifique el sonido, haya una transmisión y una integración de la información audible por parte del SNC.

En el SNC esta información viaja por la vía auditiva ascendente, mientras se van analizando e interpretando los patrones más complejos del sonido estimulante para finalizar integrando el mensaje en la corteza auditiva. Si la información auditiva no llega hasta la corteza, no seremos conscientes de oírla y tampoco podremos relacionar el estímulo con informaciones procedentes de otros receptores sensoriales. Debe realizarse la integración de toda esta información para dar una respuesta adecuada al estímulo auditivo primario (Gil-Loyzaga, 2005). Además debe existir un control de la entrada de estímulo por parte de las vías centrales y un análisis previo de frecuencias e intensidades. Por este motivo el órgano de Corti está inervado por tres tipos de fascículos cuyas fibras conectan las células sensoriales auditivas (Gil-Loyzaga, 1997b; Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007b; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010) con la vía auditiva del SNC:

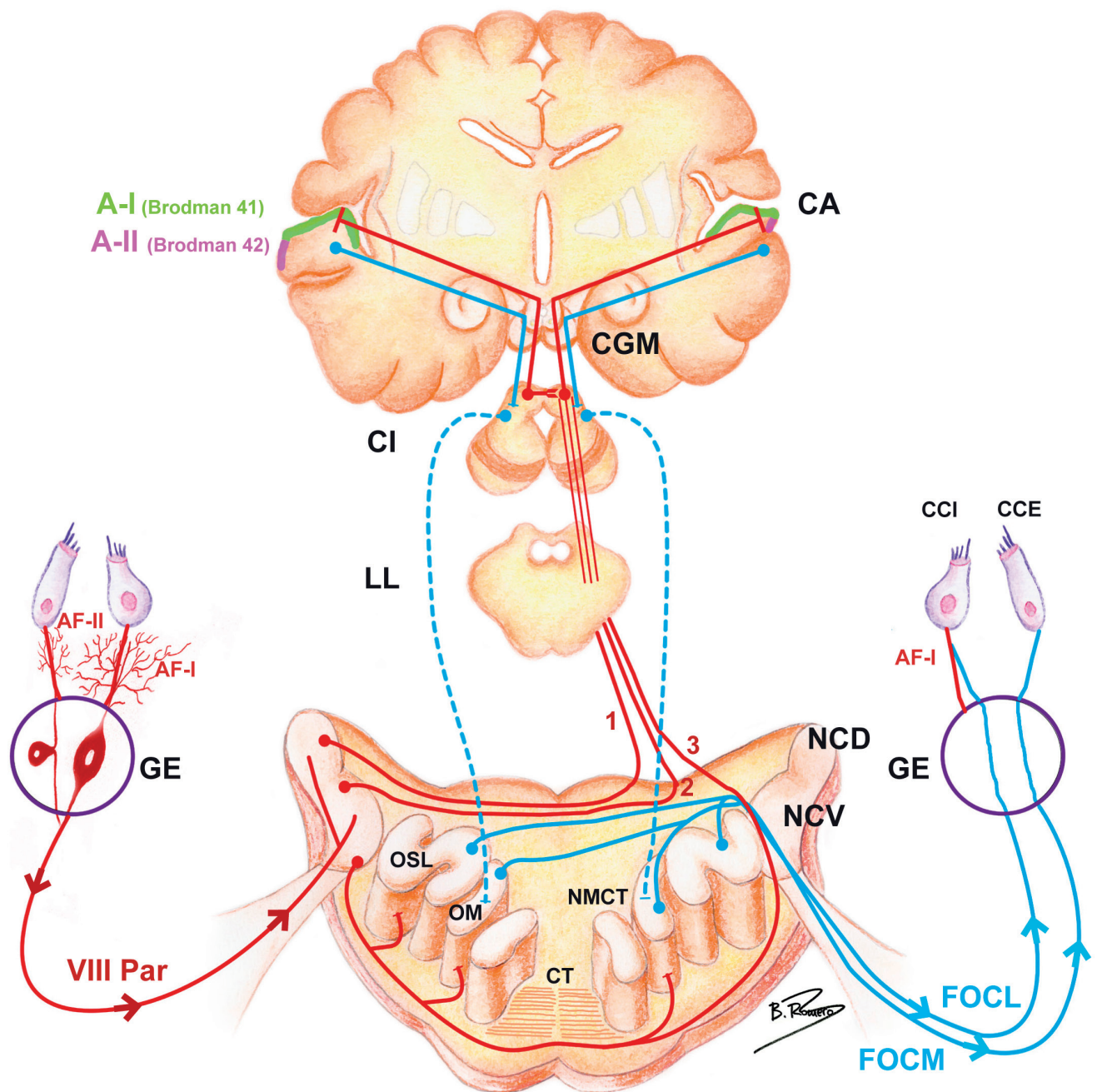


Figura 5: Vía Auditiva. Vía auditiva ascendente (rojo) y vía auditiva descendente (azul). El esquema se centra en la zona de la protuberancia, donde se sitúan los Núcleos Cocleares, el Complejo Olivar Superior y el Cuerpo Trapezoides. CA, Corteza Auditiva; A-I, Área I de la corteza auditiva; A-II, Área II de la corteza auditiva; CCE, Célula Ciliada Externa; CCI, Célula Ciliada Interna; CGM, Cuerpo Geniculado Medial; CI, Colículo Inferior; CT, Cuerpo Trapezoides; FOCL, Fascículo Olivococlear Lateral; FOCM, Fascículo Olivococlear Medial; GE, Ganglio Espiral; LL, Lemnisco Lateral; NCD, Núcleo Coclear Dorsal; NCV, Núcleo Coclear Ventral; OSL, Olivar-Superior Lateral; OSM, Oliva Superior Medial; NMCT, Núcleo Medial del Cuerpo Trapezoides y VIII par, Nervio estatoacústico.

- **Fascículo Aferente:** Lo constituyen las dendritas de las neuronas de tipo I y tipo II del ganglio espiral coclear cuyas dendritas inervan a las CCIs y CCEs respectivamente. Los axones de estas neuronas forman la parte auditiva del VIII par nervioso, y contactan con los núcleos cocleares del tronco cerebral a los que llevan la información del receptor auditivo.
- **Fascículo Eferente:** Sus fibras van desde los centros superiores de control como el COS, cuyas neuronas envían sus axones a hacer sinapsis con las dendritas del fascículo aferente, de las neuronas tipo I, o con el polo basal de las CCEs.
- **Fascículo Simpático:** Procede de neuronas de la cadena de los ganglios cervicales. En el receptor auditivo, estas fibras presentan una distribución eminentemente perivascular (Gil-Loyzaga, 1997b; Carricondo et al., 2014).

a) Inervación Aferente del órgano de Corti y las vías auditivas ascendentes

a.1) El ganglio espiral y el nervio auditivo:

La inervación aferente del receptor auditivo (Fig. 4 y 5) la componen neuronas cuyos somas se sitúan en el ganglio espiral coclear y cuyas terminaciones dendríticas inervan el polo basal de las células sensoriales del órgano de Corti (Carricondo y Romero-Gómez, 2017). El ganglio espiral se encuentra situado en el interior del canal modiolar de Rosenthal. Los axones de estas neuronas forman el VIII par nervioso, el nervio vestibulococlear, que entra en el cráneo por el conducto auditivo interno y se dirige a los núcleos cocleares, en la protuberancia del tronco cerebral. En el ganglio espiral se produce el primer paso de información desde el receptor auditivo a la vía auditiva ya que las neuronas del ganglio espiral coclear ponen en contacto el órgano de Corti con los núcleos cocleares (Fig. 5). El ganglio espiral está constituido en el ser humano por entre 30.000 y 50.000 neuronas (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007a) de dos tipos:

a.1.1) Neuronas aferentes de tipo I

Constituyen el 95% de la población del ganglio espiral. Son neuronas bipolares y mielinizadas en toda su superficie, incluso en el soma, para poder transmitir el potencial de acción de manera rápida y eficaz al terminal axónico. Sus dendritas, tras entrar en el receptor por la habenula perforata, inervan a las CCIs radialmente, mediante una sinapsis excitadora Gray tipo I. Cada CCI recibe conexiones sinápticas de entre 10-20 neuronas tipo I (Fig. 4) (Gil-Loyzaga y Pujol, 2010). El neurotransmisor de esta sinapsis es el GLU (Fig. 6) (Eybalin, 1993).

- Activación de las fibras aferentes de tipo I:

Las neuronas aferentes de tipo I del ganglio espiral coclear inervan en exclusiva a las CCI por medio de sinapsis dendrosomáticas con el polo basal de la célula. Estas sinapsis tienen dos características fundamentales: Que la sinapsis es glutamatérgica, tipo Gray I, activadora y soportada por grandes cuerpos y vesículas presinápticas en el polo basal de la CCI, y segundo, que cada CCI queda inervada por numerosas fibras aferentes de tipo I (Fig. 4) (Gil-Loyzaga, 1997b; Carricondo et al., 2014).

El GLU activa los receptores glutamatérgicos postsinápticos de la dendrita de tipo I que, al igual que en el SNC, son ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos, NMDA y no-NMDA (kainato y AMPA) (Gil-Loyzaga, 1997b; Gil-Loyzaga, 2007) se activan abriendo los canales iónicos que permiten la entrada en la neurona de Na^+ , agua, y también de Ca^{2+} por canales voltodependientes específicos. La entrada de Na^+ y Ca^{2+} en la neurona produce su despolarización y el consiguiente potencial de acción en la fibra, que se transmitirá al SNC.

Este proceso se amplifica gracias a que el sistema es redundante y esta inervación por neuronas tipo I del ganglio espiral, se da entre 10-15 veces para cada CCI (Fig. 4). De esta forma, cuando la CCI se activa, el glutamato liberado puede ser captado por varias neuronas a la vez, lo que supone un mecanismo de amplificación de la señal, de codificación de la amplitud de la señal sonora y, también, un método para asegurar que aunque se pierdan neuronas, pueda transmitirse la información a la vía auditiva (Sergeyenko et al., 2013).

Las neuronas del ganglio espiral presentan una selectividad frecuencial muy alta, que mantiene la tonotopía coclear, y además, permite una resolución auditiva muy eficaz, ya que con sonidos de muy baja intensidad, se activarán muy pocas neuronas, aumentando este número a medida que aumenta la intensidad del sonido, dado que la vibración de la membrana basilar activa también a un mayor número de CCIs (Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007b ; Gil-Loyzaga y Pujol, 2010).

a.1.2) Neuronas aferentes de tipo II:

Son solo el 5% de la población del ganglio espiral (Spoendlin, 1972; Ruggero et al., 1982). Son neuronas pseudomonopolares, amielínicas (Gil-Loyzaga y Pujol, 2010) y de menor tamaño que las de tipo I, aunque su tamaño va a depender de la especie animal,

siendo de mayor tamaño en roedores y además, estas neuronas expresan en su citoesqueleto neurofilamentos de 200kD, lo cual permite su detección (Berglund y Ryugo, 1991). Cada una de sus dendritas va a inervar a unas 10-20 CCEs, por medio de sinapsis Gray tipo II, de manera que en sus contactos sinápticos se van a ramificar abundantemente (Fig. 4).

Al igual que las neuronas aferentes tipo I, entran en el órgano de Corti a través de la habenula perforata, pero estas, posteriormente se distribuyen por el plexo espiral interno, ramificándose y cruzando el túnel de Corti, por su base, para llegar a las CCEs e inervarlas. Las aferencias de tipo-II contactan con preferencia CCEs de la misma fila y prefieren inervar las CCEs de la primera fila, la más interna y cercana al pilar externo del túnel de Corti, sin embargo, el número de CCEs contactadas aumenta en la segunda y también en la tercera fila y desde la base al ápex coclear (Fig. 4) (Simmons y Liberman, 1988). Recientemente se ha descrito que estas sinapsis excitatorias son glutamatérgicas y están moduladas por ATP (Weisz et al., 2009, 2012, 2014; Liu et al., 2015).

La inervación del receptor auditivo en la cóclea varía en función de la zona, existiendo diferencias entre la base y el ápex. Así, las sinapsis de las fibras aferentes son mucho más abundantes en el ápex que en la base, lo cual puede indicar diferencias regionales y funcionales de gran importancia (Pujol et al., 1992; Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga y Poch Broto, 2007a; Carricondo et al., 2014).

La tonotopía coclear se mantiene también el ganglio espiral, cuya disposición axonal está determinada, de manera que las fibras más profundas del nervio son las que provienen de las zonas más apicales de la cóclea, mientras que las fibras más superficiales proceden de la base coclear. Así, se consigue que todas las fibras tengan la misma longitud y que el paso de información sea por lo tanto equitativo en tiempo desde la activación a lo largo de toda la cóclea hasta los núcleos cocleares (Gil-Loyzaga, 1997b; Gil-Loyzaga, 2005).

a.2) Los núcleos cocleares

Son dos estructuras simétricas que forman el segundo paso de la vía auditiva. Se localizan en el tronco cerebral, laterales y posteriores al cuerpo restiforme, en el límite entre la protuberancia y el bulbo raquídeo y, anatómicamente, se dividen en dos zonas: núcleo coclear dorsal (NCD) y ventral (NCV) (Fig. 5), aunque este último se subdivide en anterior (núcleo coclear anteroventral o NCAV) y posterior (núcleo coclear posteroventral o NCPV) (Lorente de No, 1981):

- **NCD:** Presenta estructura de corteza con tres capas: Región Central, Capa Granular y Capa Molecular ([Merchán Pérez, 1992](#)). Contiene neuronas fusiformes o piramidales, neuronas grano y neuronas gigantes.
- **NCAV:** Contiene neuronas de axón corto, estrelladas multipolares ([Merchán Pérez, 1992](#)) y neuronas penachadas o bushy que reciben contactos de las fibras aferentes del ganglio espiral, los denominados bulbos de Held ([Ramón y Cajal, 1909](#); [Lorente de No, 1933](#); [Harrison e Irving, 1965](#)) y que mantienen la tonotopía que reciben de las neuronas aferentes cocleares.
- **NCPV:** Neuronas penachadas, octopus, ([Osen, 1969](#)). Que se activan al inicio y al final del estímulo, y multipolares o estrelladas, que responden a los cambios de intensidad del sonido ([Carricondo et al., 2014](#)).

A los núcleos cocleares llegan los axones de las neuronas del ganglio espiral, que al entrar en el núcleo se dividen en forma de “V” ([Lorente de No, 1933](#)), donde una de las ramas se dirige hacia el NCAV mientras que la otra va hacia el NCPV y el dorsal NCD (Fig.5). Esta disposición mantiene la organización tonotópica coclear porque los axones que proceden del ápex coclear, que se localizaban profundos en el VIII par, se disponen en la superficie de los núcleos cocleares, mientras que los axones procedentes de regiones más bajas de la cóclea, y que se van localizando en lugares cada vez más superficiales del nervio auditivo, se disponen cada vez más profundos en los núcleos cocleares. Según esto, la tonotopía de los núcleos cocleares quedaría con las frecuencias más graves representadas en las regiones superficiales, mientras que las agudas se analizarían en las regiones profundas de los núcleos cocleares, permitiendo la activación de las neuronas situadas en una banda concreta, el plano de isofrecuencia ([Gil-Loyzaga, 2005](#)). Cada fibra nerviosa aferente hace sinapsis con diferentes tipos de neuronas, teniendo cada tipo una respuesta electrofisiológica diferente y específica que generan un nivel de procesamiento de la información auditiva mucho más complejo ([Gil-Loyzaga, 2005](#)).

En los núcleos cocleares se produce también un análisis binaural de la información, comparando las señales recibidas desde el núcleo de cada lado para recopilar toda la información que provenga del receptor y permitir la localización de la fuente del sonido. Este

análisis es posible gracias a que la información se cruza entre ambos lados de la vía auditiva por las fibras que salen de los núcleos cocleares, cruzan la línea media y se dirigen a diferentes núcleos de la vía contralateral formando las denominadas estrías acústicas (Fig. 5):

- **Estría Acústica Dorsal:** La forman los axones de neuronas del NCD y algunas del NCV que van hacia el colículo inferior contralateral, pasando por el fascículo del lemnisco lateral (Carricondo et al., 2014).
- **Estría Acústica Intermedia:** Fibras procedentes de las neuronas octopus del NCPV que suben por el lemnisco lateral hasta su núcleo (Carricondo et al., 2014).
- **Estría Acústica Ventral o Fascículo del Cuerpo Trapezoides:** Formada por axones que van a los núcleos del COS de ambos lados desde neuronas del NCAV y neuronas de la raíz del nervio auditivo. Las fibras de estas neuronas olivares ascienden por el lemnisco lateral haciendo sinapsis con las neuronas de su núcleo y con las del colículo inferior (Carricondo et al., 2014).

a.3) El Complejo Olivar Superior

Descrito por Santiago Ramón y Cajal en 1909, está formado por una serie de núcleos y campos perinucleares situados de forma simétrica, en la zona ventral de la protuberancia del tronco cerebral a ambos lados de la línea media (Fig. 5):

- **Núcleo olivar superior lateral:** Con forma de S en el gato (Ramón y Cajal, 1909) y forma de N en los roedores (Harrison y Feldman, 1970), está formado por neuronas multipolares fusiformes, situadas en la parte más central del núcleo (Merchán Pérez, 1992). En la periferia se hallan las neuronas marginales, menos numerosas, constituyendo el borde del núcleo (Ramón y Cajal, 1909) y en la rata hay un tercer tipo neuronal multipolar (Harrison y Feldman, 1970), similar a las neuronas fusiformes descritas en el ratón (Warr, 1992; Merchán Pérez, 1992).
- **Núcleo olivar superior medial:** Formados por células fusiformes con dendritas en ambos polos (Ramón y Cajal, 1909) y neuronas marginales, situadas en la periferia del núcleo (Carricondo et al., 2014).

- **Núcleos del cuerpo trapezoides:** Constituido por un grupo de neuronas globulares, los cálices de Held.

El COS es un área de intercambio de información procedente los núcleos cocleares izquierdo y derecho, de manera que participa en la localización espacial de la fuente del sonido estimulante mediante la comparación de la intensidad percibida por cada oído. Constituye un centro de integración de las vías aferentes, que llegan del receptor auditivo y un centro de control del estado mecánico por medio de las fibras eferentes que vuelven al receptor. Además controla varios de los circuitos reflejos que activan los músculos del oído ([Gil-Loyzaga, 2005](#)). En él se distinguen tres tipos de fibras nerviosas (Fig. 5):

- La vía ascendente, que transmite el estímulo auditivo desde los núcleos cocleares al resto de la vía auditiva.
- Las fibras descendentes, que proyectan sobre el receptor auditivo y los núcleos cocleares, ([Carricondo et al., 2014](#)) modulando la actividad del órgano de Corti, mediante el denominado haz olivococlear, formado por dos fascículos eferentes:
 - **El fascículo eferente olivococlear lateral (FOCL)**
 - **El fascículo eferente olivococlear medial (FOCM)**
- Además hay otras fibras que conectan el COS con otros centros del sistema nervioso:
 - El el nervio trigémino y el nervio facial que inervan los músculos del oído medio, el tensor del tímpano y el estapedial, respectivamente. Mediante los reflejos estapedial (músculo del estribo) y acústico (músculo del martillo) se constituye un sistema para la protección-modulación del receptor auditivo bloqueando la entrada del sonido, tensando la membrana timpánica y la oval, o como mecanismo modulador de la llegada de estímulo al oído interno.
 - El nervio motor ocular lateral, sincronizado para localizar el origen del sonido visualmente y de forma rápida y eficaz.
 - Los núcleos de la formación reticular, para las reacciones vegetativas, sistemas de alerta, etc. ([Carricondo et al., 2014](#)).

b) Inervación Eferente del órgano de Corti y vías auditivas descendentes

Desde el COS situado en el tronco cerebral, llegan las fibras eferentes que inervan el receptor auditivo, constituyendo el haz olivococlear o de Rasmussen que sale del cráneo acompañando a una rama del nervio vestibular, hasta la anastomosis de Oort, o conducto auditivo interno, donde se une al nervio coclear y entra en la cóclea por la espira basal (Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga, 1995). Desde allí los axones ascienden por la parte externa del canal espiral o de Rosenthal, constituyendo el haz espiral intraganglionar (Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga, 1995).

Estas fibras constituyen el elemento efector de circuitos de tipo reflejo en el que participan neuronas del ganglio espiral, los núcleos cocleares, además de las del complejo olivar superior y que se encargan del filtrado de la señal neural que sale del órgano de Corti, de la modulación de la actividad del receptor y participan en la protección del mismo frente a sonidos de elevada intensidad (Gil-Loyzaga, 1995; Carricondo et al., 2014).

Según su núcleo de origen en el COS, se distinguen dos fascículos de axones que llegan a la cóclea e inervan áreas distintas del órgano de Corti: el sistema eferente olivococlear lateral (FOCL) y el medial (FOCM) (Fig. 5y 6)(Gil-Loyzaga y Parés Herbuté, 1989; Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga, 1995).

b.1) El fascículo olivococlear medial

Procede de neuronas mielinizadas del COS, situadas en la región ventromedial del cuerpo trapezoides y su entorno. Tras atravesar la habénula perforata sus axones cruzan el túnel de Corti para establecer contactos axo-somáticos de tipo Gray I con el polo basal de las CCEs (Fig.6) (cada fibra inerva unas 10 CCEs) de ambas cócleas. Así, un 30 % de las fibras del fascículo inerva la cóclea ipsilateral mientras que el 70 % restante de fibras del fascículo cruza la línea media alcanzando la cóclea contralateral para inervar a las CCEs. Su funcionalidad se ha relacionado con la iniciación y regulación de la actividad contráctil de las CCEs ya que son de naturaleza colinérgica aunque también se ha encontrado CGRP (Fig.6) (Gil-Loyzaga, 1995).

b.2) El fascículo eferente lateral

Formado por axones finos y amielínicos que llegan al receptor auditivo, procedentes de neuronas pequeñas de la oliva superior lateral, mayoritariamente ipsilateral (Fig. 6). Tienen una distribución radial tras atravesar la habénula perforata y realizan contactos sinápticos

axo-dendríticos Gray tipo II con las fibras aferentes tipo I, bajo las CCIs en el plexo espiral interno. Estos contactos pueden ser en passant (contactos laterales del axón eferente sobre la dendrita aferente), o terminales. En estas sinapsis existen diversos neurotransmisores como

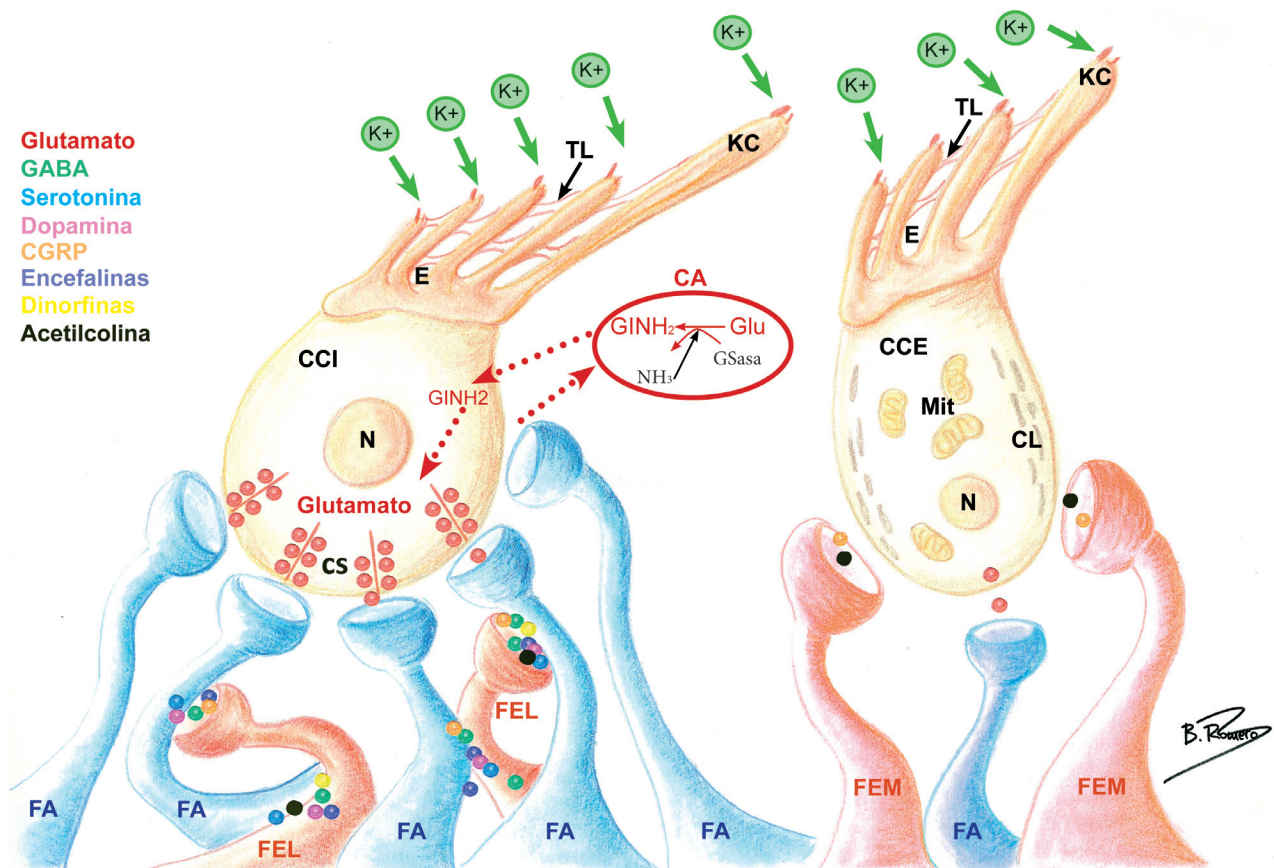


Figura 6: Neurotransmisores aferentes en la cóclea: Representación esquemática de la inervación de las células ciliadas internas (CCI) y de las células ciliadas externas (CCE). Cuando se produce la deflexión de los kinetocilios (KC), los estereocilios (E), unidos a ellos por puentes fibrilares glicoproteicos, "tip-links" (TL), se deflexionan también, abriendo sus canales específicos de K^+ . La entrada de K^+ despolariza la membrana de la célula, activándola e induciendo la liberación de GLU por su polo basal. Se activan así las fibras aferentes, de tipo I (FA I) por las CCIs, y las de tipo II (FA II) por las CCEs. Las fibras del sistema eferente lateral (FEL) inervarán a las FA I, mientras que las del eferente medial (FEM) inervarán a las CCEs. A su vez, el GLU en exceso, es recaptado por las células acompañantes (CA) y transformado por la enzima glutamino-sintetasa (GSasa) y un grupo amino del NH_3 , en glutamina (GINH₂), que será reintroducida en la CCI para formar de nuevo GLU en las vesículas sinápticas. CL, Cisternas Lamelares; CS, Cuerpo sináptico; Mit, Mitocondria; N, Núcleo. Los neurotransmisores más importantes implicados en las sinapsis se detallan a la izquierda-arriba y se corresponden con los colores de cada neurotransmisor.

Ach, GABA, serotonina, dopamina y neuropéptidos como encefalinas, dinorfinas y CGRP que funcionan como neuromoduladores de la actividad de la fibra aferente de tipo I del ganglio espiral (Fig. 6) (Gil-Loyzaga, 1995).

c) Centros superiores de la vía auditiva

A partir del COS, la vía auditiva alcanza, a través de las tres estrías acústicas indicadas anteriormente, los centros superiores de la vía auditiva el lemnisco lateral, el colículo inferior, el cuerpo geniculado medial del tálamo y la corteza auditiva, donde se realizan los análisis más complejos y finales del sonido, llegando a la consciencia del mismo. Todos ellos mantienen una cierta organización tonotópica, aunque también poseen zonas en las que el análisis de la señal no requiere de esa organización (Gil-Loyzaga, 2005).

Contactan con el núcleo del lemnisco lateral las fibras que ascienden procedentes del NCD, del NCV y del COS. Se organiza en dos regiones: El complejo ventral, del lemnisco lateral que recibe información del NCV ipsilateral, sin una distribución tonotópica precisa, y que estaría implicado en el análisis de la duración de un sonido complejo, como el lenguaje. Por otro lado, el colículo inferior participa en el análisis frecuencial del sonido y en el análisis interaural de la duración y la intensidad sonora. De hecho, las cortezas dorsal y externa del colículo inferior tienen neuronas polimodales, que respondiendo no solo a estímulos auditivos, sino también visuales y táctiles, y estarían participando en el análisis complejo del lenguaje e, incluso, en la recepción de sonidos nuevos (Sánchez Malmierca y Merchán Cifuentes, 2007).

El cuerpo geniculado medial del tálamo, por su parte, estaría implicado en el análisis de las diferencias interaurales de tiempo e intensidad y con el procesamiento emocional de los sonidos (Sánchez Malmierca y Merchán Cifuentes, 2007). Mientras que la corteza auditiva, dividida en dos áreas, AI y AII, finalizaría el análisis de la señal auditiva.

Así, la corteza auditiva se encarga de realizar el procesamiento final de la localización tridimensional de la fuente sonora, en el área AII, y de la identificación definitiva de las características del sonido, en el AI, así como de la integración de los datos auditivos con los del resto de los sistemas sensoriales en las áreas de integración polimodal. La integración temporal y espectral de los sonidos permitirá la discriminación de pequeñas variaciones de las características de los sonidos complejos tan específicas de lenguaje (Gil-Loyzaga, 2005).

1.2. REGULACIÓN ENDÓGENA DEL SISTEMA AUDITIVO:

El sistema auditivo está modulado por diferentes mecanismos como el sistema cardiovascular, el SNC y los sistemas de neurotransmisores y hormonas:

1.2.1. Neurotransmisores excitadores de la vía auditiva aferente

Son muchas las sustancias neuroactivas implicadas en la neurotransmisión de la información que porta el sonido desde las células sensoriales del órgano de Corti al SNC a través de la vía auditiva. (Fig. 6).

a) Glutamato

Es el principal neurotransmisor excitador del SNC, tal y como se ha comentado anteriormente, las aferencias cocleares de tipo-I son neuronas glutamatérgicas (Fig. 6) (Eybalin, 1993; Puel, 1995), hecho que se ha demostrado desde su primera descripción en 1976 (Godfrey et al., 1976) y con posteriores comprobaciones desde el punto de vista morfológico, bioquímico y electrofisiológico (Bobbin, 1979; Eybalin y Pujol, 1983; Schwartz y Ryan, 1986; Altschuler et al., 1989; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990; Gil-Loyzaga et al., 1993a; Carricondo et al., 2002; Ruel et al., 2007). También, se ha descrito (Eybalin, 1993) el proceso de recaptación del GLU que tiene lugar posteriormente en estas sinapsis glutamatérgicas para limpiar este GLU liberado en exceso, inactivarlo y reciclarlo y mantener los niveles de glutamina constantes para formar de nuevo las vesículas sinápticas con GLU que será liberado de nuevo a la sinapsis (Eybalin y Pujol, 1983).

Las células gliales cocleares implicadas en el sistema de recaptación de GLU (Fig. 6) son las células de Schwann que, situadas en la lámina espiral ósea, presentan la actividad de la enzima glutamina-sintetasa necesaria para convertir el GLU en glutamina (Eybalin et al., 1996) y evitar daños neurotóxicos en la fibra aferente de tipo-I, derivados del aumento de concentración de GLU en la hendidura sináptica (Choi y Rothman, 1990).

1.2.2. Neurotransmisores Inhibidores de la Vía eferente

Son sustancias neuroactivas, que se liberan desde los terminales axónicos que provienen del COS y cuyos efectos pueden alterar la activación de las neuronas del sistema aferente coclear (Gil-Loyzaga, 1995). Se pueden clasificar por su comportamiento neuroquímico en dos tipos: Neurotransmisores “clásicos”, como la acetilcolina, el GABA y la dopamina y sustancias neuromoduladas.

ras, como la encefalinas, dinorfinas y CGRP y todas ellas regulan la función auditiva (Gil-Loyzaga et al., 1988; Gil-Loyzaga y Parés-Herbute, 1989; Merchan-Perez et al., 1990a; 1990b; 1990c; 1993; 1994; Gil-Loyzaga et al., 1997; Vicente-Torres et al., 1998).

a) Dopamina

La dopamina es uno de los principales neurotransmisores de las fibras eferentes que van desde el OSL a inervar las neuronas de tipo I del ganglio espiral de la cóclea (Vicente-Torres et al., 1993). Es un neurotransmisor del grupo de las catecolaminas, que contiene un grupo catecol y otro amino y se sintetiza a partir del aminoácido tirosina por la enzima tirosina hidroxilasa (TH).

La existencia de catecolaminas en la cóclea, fue descrita en 1966 de forma indirecta, por histofluorescencia inducida por aldehídos en las fibras simpáticas y las olivococleares, y no se describió su presencia en la cóclea hasta 1986, por Gil-Loyzaga y Parés-Herbute, que la detectaron en cócleas de ratas adultas y en desarrollo mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección electroquímica (HPLC-EC). Posteriormente solo ha sido posible su localización inmunohistoquímica por medio de las enzimas implicadas en su síntesis, como la TH que se ha localizado en el haz espiral interno (Eybalin, 1993).

Estudios inmunocitoquímicos han demostrado la presencia de tirosina hidroxilasa en la cóclea (Jones et al., 1987; Usami et al., 1988). Sin embargo, aunque con la perfusión intracoclear de DA no se obtenga un cambio en los potenciales cocleares, con estimulación acústica con ruido blanco a 70, 90 y 110 dB, aumentan los niveles del neurotransmisor con HPLC (Gil-Loyzaga et al., 1993).

Por lo tanto, y como ejemplo de la actividad de este circuito, se ha descrito que la estimulación sonora produce un incremento en el metabolismo de la dopamina en la cóclea que modularía la actividad de la fibra de tipo-I. Así, la liberación de dopamina desde los axones de la OSL, actuaría sobre los receptores dopaminérgicos D-2 descritos en estas fibras ya que la administración de piribedil, un agonista D-2, resultó en un bloqueo de los efectos nocivos de la exposición al ruido en las aferencias de tipo-I (Gil-Loyzaga et al., 1993b; 1994). Por ello, la dopamina y el resto de sustancias neuroactivas presentes en estas sinapsis pueden jugar un

papel muy importante en la modulación y la protección frente al ruido excesivo de las neuronas de tipo-I cocleares (Gil-Loyzaga, 1995).

b) GABA (ácido gamma-aminobutírico)

El GABA es uno de los inhibidores más potentes del SNC, (Tang, et al., 2014) que modula la función sináptica rápida a través de los receptores sinápticos GABA_A, pero también produce una inhibición tónica persistente a través de receptores extra-sinápticos de alta afinidad y una inhibición sináptica lenta vía GABA_B (Casparly y Llano, 2016). Se ha detectado tanto en las fibras eferentes olivococleares laterales, que llegan a las dendritas de las neuronas tipo I del ganglio espiral, como en las fibras eferentes olivococleares mediales, haciendo sinapsis con las CCE directamente, en la zona apical de la cóclea (Gil-Loyzaga 1995). Presenta grandes diferencias entre el estado del receptor en desarrollo, en donde parece ejercer un efecto neurotrófico (Merchán-Pérez et al., 1990b; 1990c).

Además, las sinapsis GABAérgicas contienen GAD, la enzima de síntesis de GABA en sus botones terminales, indicando que GABA podría sintetizarse en el terminal sináptico (Gil-Loyzaga, 1995).

c) Serotonina

La innervación serotoninérgica del receptor auditivo está compuesta por fibras nerviosas de neuronas multipolares ubicadas en el COS, que proyectan sobre las dendritas de las neuronas aferentes del ganglio espiral las cuales, conectan con las CCI y otras, que llegan a las CCEs atravesando el túnel de Corti (Gil-Loyzaga et al., 2000).

d) Acetilcolina (ACh)

La acetilcolina (ACh) es el principal neurotransmisor liberado a la sinapsis con las CCEs durante la estimulación del sistema eferente (Puel, 1995). Se ha encontrado en las fibras eferentes olivococleares mediales por medio de la detección de colinacetiltransferasa (ChAT), su enzima de síntesis, y en las fibras en “passant” y en las sinapsis con las dendritas de las neuronas tipo I del ganglio espiral (Gil-Loyzaga, 1995), procedentes de las fibras eferentes olivococleares laterales.

Existen otro tipo de sustancias neuromoduladoras, capaces de alterar la activación por la vía clásica de las neuronas aferentes de la cóclea.

e) Otras sustancias neuromoduladoras

El CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina), las Enkefalinas, las Dinorfinas y la Sustancia P (Robertson y Mulders, 2000), que han sido localizados tanto en el tronco encefálico en neuronas pertenecientes al sistema eferente lateral o en neuronas de la región periolivar alrededor del complejo olivar superior medial y del cuerpo trapezoides, así como en los terminales de las de las fibras nerviosas laterales y mediales que se conectan a las dendritas aferentes tipo I y las CCEs, respectivamente. Por lo tanto, todos podían estar implicados en la modulación del proceso auditivo, como lo sugieren los incrementos de actividad coclear observados en algunos de ellos inducidos por la estimulación sonora (Puel, 1995; Gil-Loyzaga, 1995).

1.2.3. Hormonas que modulan el sistema auditivo:

Desde hace algunos años y cada vez más, existen evidencias de que las hormonas, y en concreto las hormonas sexuales afectan a los sistemas sensoriales, como el oído interno, o las vías auditivas centrales (Frisina y Frisina, 2013). La función auditiva es muy diferente en hombres y mujeres desde el nacimiento (Jerjer y Hall, 1980; Hederstierna et al., 2010) y estudios epidemiológicos han demostrado que las mujeres presentan mejores umbrales auditivos para las altas frecuencias en todos los grupos de edad y que su pérdida auditiva asociada al envejecimiento, comienza casi 20 años más tarde que en los hombres (Hederstierna et al., 2010; Hultcrantz et al., 2006).

Muchos autores han mostrado una diferencia de género en la función auditiva y algunos, lo achacan a diferencias de los niveles de estrógenos entre machos y hembras. (Hultcrantz et al., 2006). Por otra parte, los esteroides que intervienen en los ciclos reproductores (estrógenos y progesterona), regulan las neuronas y el sistema noradrenérgico, dopaminérgico y serotoninérgico (Scholtz et al., 1998; Genazzani et al., 2000).

a) Estrógenos

Los estrógenos intervienen en las funciones fisiológicas de muchos órganos y sistemas, tanto en hembras (Nilsson et al., 2001) como en machos (Sharpe, 1998; Lombardi et al., 2001) y tienen influencia en el sistema auditivo a varios niveles. Por ejemplo a nivel coclear, se han encontrado receptores de estrógenos α y β en humanos (Stenberg et al., 2001) y en roedores (Stenberg et al., 1999), en el ganglio espiral, en neuronas tipo I, en la estría vascular, y en vasos sanguíneos,

lo que sugiere que pueden estar influyendo en la transmisión auditiva, así como en el balance electrolítico y en el flujo de líquidos endolinfáticos (Lee y Marcus, 2001) y en el flujo sanguíneo (Laugel et al., 1987).

b) Progesterona

La progesterona es una hormona ovárica secretada en el cuerpo lúteo durante la fase lútea del ciclo ovárico y también es producida en las glándulas adrenales y el SNC. Es un precursor de otras hormonas esteroideas y actúa como un neuroesteroide, influyendo sobre el SNC (Baulieu, 1998). Los receptores específicos de progesterona no han sido identificados en el sistema auditivo, pero en general tiene un papel inhibitorio, y en otros sistemas equilibra el efecto excitatorio de los estrógenos (Katzenellenbogen, 2000).

El ciclo ovárico o menstrual en mujeres tiene una duración de aproximadamente 28 días y comienza con el primer día de la menstruación. El nivel de estrógeno aumenta durante la fase folicular para alcanzar el primer pico justo antes de que surja la hormona luteinizante (LH). La ovulación ocurre 36-48h después de que surja la LH. La progesterona comienza su aumento desde el comienzo de la LH, seguida de la luteinización de las células granulosas. El cuerpo lúteo continua secretando progesterona y en menor grado, estrógenos, que aumentan su segundo pico cerca de la mitad de la fase luteal. Los esteroides ováricos tienen un papel muy influyente en el sistema nervioso central y por lo tanto, en el sistema auditivo, por medio de la interacción con sus neurotransmisores (Al-Mana et al., 2010).

En el caso de las ratonas, el ciclo estral es mucho más corto, dura aproximadamente 4 días, y se puede dividir en 4 fases: proestro (12h), estro (12h), metaestro (21h) y diestro (57h). Al comienzo de la fase de proestro se producirá el pico de liberación de estrógenos, habiendo otro pico mucho menor en la fase estro. (Caligioni, 2009). La progesterona sin embargo aumenta al principio del diestro, y cae bruscamente al final de esta etapa, el día 2 (Emanuele et al., 2002). La LH en este caso, tiene su máximo de actividad en la parte central de la fase de proestro y los picos de máxima actividad de la FSH se producen fundamentalmente al final de la fase de proestro y un pico menos elevado en la mitad de la fase de metaestro. (Fig. 7).

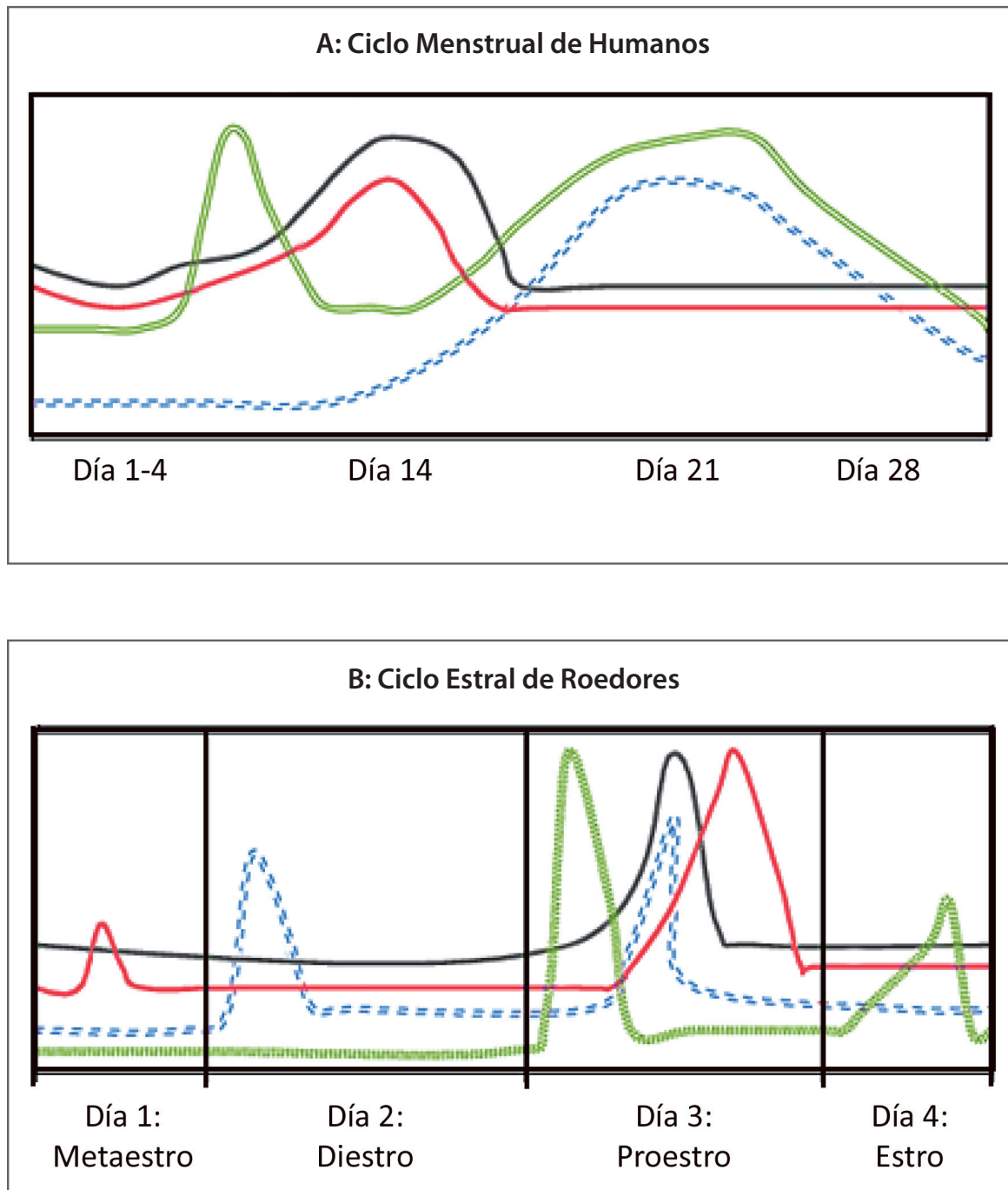


Figura 7: Ciclo estral y menstrual. Azul, Progesterona; Negro, LH; Rojo,

FSH; Verde, Estrógenos. (Emanuel et al., 2002) **A. Ciclo Menstrual Humano.**

Gráfica de las hormonas más representativas en el ciclo menstrual y sus picos de mayor actividad respecto a los días de duración del ciclo. **B. Ciclo Estral de roedores.** Gráfica de las hormonas más representativas en el ciclo estral de los roedores y sus picos de mayor actividad respecto a los días de duración del ciclo en función de las cuatro fases en las que se divide el ciclo: metaestro, diestro, proestro y estro. El período de mayor actividad de todas las hormonas es la fase proestro.

1.3. LA PATOLOGÍA AUDITIVA: LAS HIPOACUSIAS

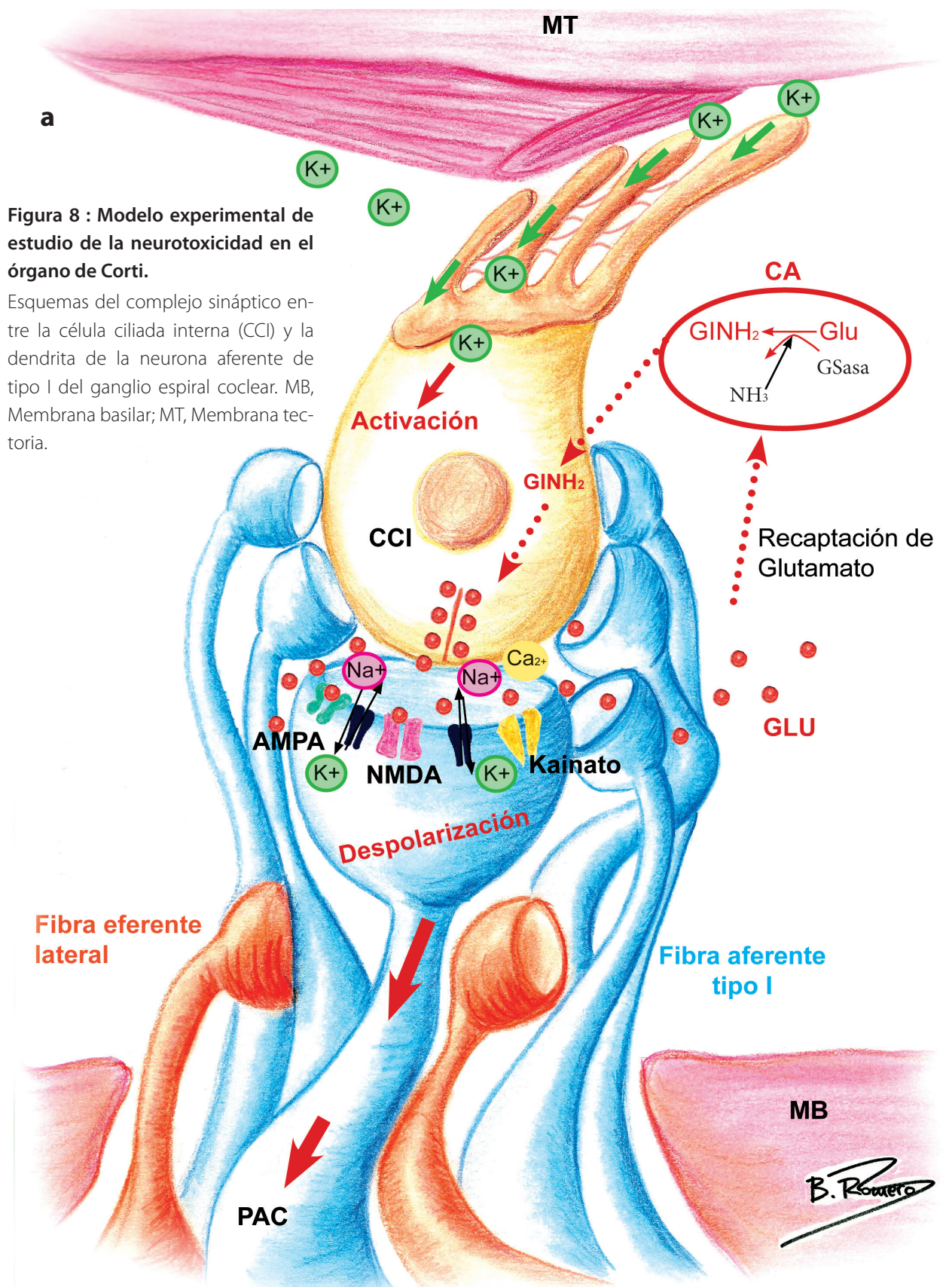
Hay varias patologías que afectan al sistema auditivo y que pueden provocar una pérdida, irreversible en la mayoría de las ocasiones, de su funcionalidad. Las hipoacusias se pueden clasificar en distintos tipos en función de la localización de la lesión:

- **Hipoacusia de conducción:** La patología se localiza en el oído externo y/o medio, disminuyendo la eficacia del paso de la señal al oído interno.
- **Hipoacusia de percepción o neurosensorial:** En este caso lo que se ve afectado es el receptor auditivo y/o la vía auditiva. Entre las causas más habituales de las hipoacusias de percepción se encuentran la predisposición genética, infecciones, trauma acústico, la exposición a sustancias ototóxicas o el envejecimiento del propio sistema auditivo.

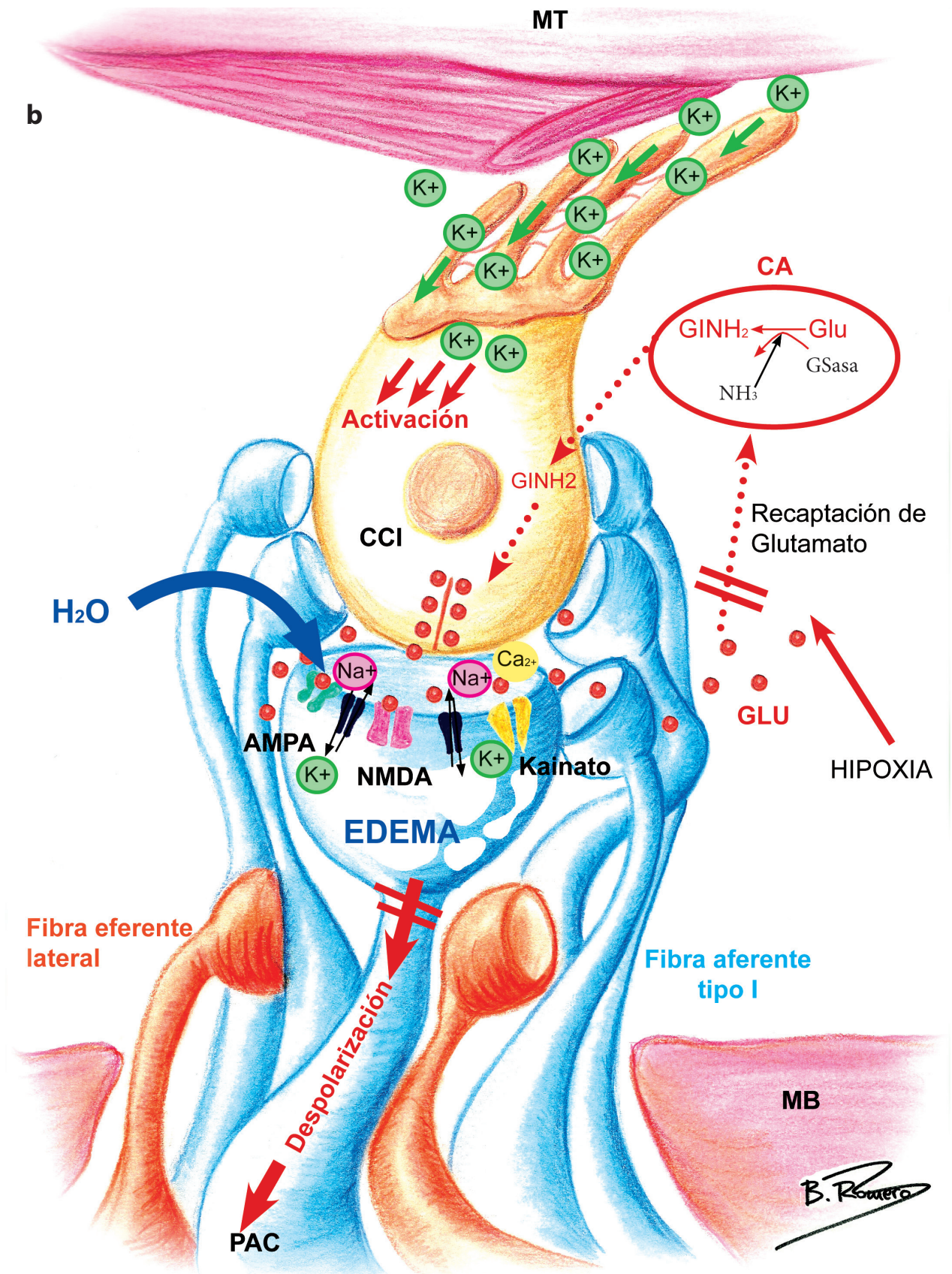
1.3.1. Etiologías de las hipoacusias neurosensoriales

a) Trauma acústico y excitotoxicidad

El trauma acústico es una patología auditiva asociada a las sociedades humanas industrializadas (Gil-Carcedo et al., 1999) y que, básicamente, supone el daño auditivo, habitualmente del receptor o de las neuronas primarias cocleares, tras la exposición a ruido. Hay que indicar que dependiendo del tipo de exposición al ruido, el trauma en el receptor puede presentar cambios. Así, si el ruido es de elevada intensidad y brusco, la afectación primaria se suele presentar en las CCs del órgano de Corti, con pérdida de sus cilios y de las propias células receptoras, mientras que la exposición a ruidos de intensidad media o moderada provoca daños cuando esta exposición es continuada en el tiempo y presenta los rasgos de una patología excitotóxica en el receptor auditivo (Eybalin, 1993). Se ha descrito que los efectos de este tipo de hipoacusia son muy similares a los producidos en si mismos por otras patologías neurotóxicas como procesos de hipoxia/isquemia en el receptor auditivo. Por ello, se considera que tienen una base fisiopatológica común (Bobbin, 1979; Eybalin y Pujol, 1983; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990; Gil-Loyzaga et al., 1993a; Carricondo et al., 2002) y van a afectar tanto al elemento sensorial del órgano de Corti, como a las neuronas del ganglio espiral coclear, como consecuencia de la neurotoxicidad endógena del neurotransmisor GLU. En concreto, se trata de la disfunción de la sinapsis entre la CCI y la fibra aferente de tipo I por el aumento anómalo de la concentración de GLU en la sinapsis que hace que pase de ser activador a



a: Activación de la CCI: Con la entrada de ión potasio (K^+) en la CCI, ésta se despolariza y produce la liberación de Glutamato (GLU) a la sinapsis. Los receptores ionotrópicos glutamatérgicos postsinápticos (ácido kaínico, el AMPA, el NMDA), presentes en la dendrita de la neurona aferente de tipo I, al activarse con el GLU, generan un potencial de acción (PAC) en la neurona aferente coclear, que se transmitirá a la vía auditiva. El GLU es recaptado de la sinapsis por células acompañantes (CA) y transformado en glutamina ($GINH_2$), que volverá a la CCI para transformarse de nuevo en GLU.



b: Neurotoxicidad inducida por GLU en la sinapsis receptor auditivo: la hipoxia o el traumatismo acústico induce acumulación excesiva de GLU en la hendidura sináptica. EL incremento de GLU en la sinapsis provocará una sobre-activación de los receptores de GLU postsinápticos (ácido kaínico, el AMPA, el NMDA) y la entrada excesiva de iones (Na^+ y Ca^{2+}) y agua al terminal dendrítico. Esta situación puede dar lugar a la formación de edemas dendríticos y el desequilibrio osmótico del terminal puede provocar disfunción en la producción de potenciales de acción y, por lo tanto, sordera.

ser un potente neurotóxico (Schwartz y Ryan, 1986; Altschuler et al., 1989) produciendo un proceso neurotóxico específico denominado excitotoxicidad (Carricondo, 2000).

En estas condiciones patológicas, como las del trauma acústico, la activación prolongada de las células sensoriales, provoca una liberación masiva de GLU que deriva en una sobreexcitación neuronal. Curiosamente, los mismos efectos de esta sobreexcitación neuronal derivada de una sobreexposición al ruido, se observan también tras procesos de hipoxia o de isquemia coclear (Eybalin y Pujol, 1983; Eybalin, 1993; Carricondo et al, 2002) en los que disminuye la recaptación del GLU desde la hendidura sináptica, mediante mecanismos ATP dependientes. Así, la activación continuada de los receptores glutamatérgicos provoca la entrada masiva de iones Ca^{2+} , que activan numerosas cadenas enzimáticas y alteran el metabolismo mitocondrial. También la entrada de Na^+ produce una despolarización mantenida que genera la entrada excesiva de agua, que conduce a la formación de un edema dendrítico y, si las condiciones se mantienen, a la lesión neuronal, provocando la muerte celular (Choi y Rothman, 1990; Carricondo et al., 2002). Además, la exposición a ruido en la cóclea, genera estrés oxidativo en sus tejidos (Yamane et al., 1995; Ohlemiller et al., 1999), produciendo daño en la mitocondria a través de la formación de especies reactivas al oxígeno (ROS), que puede tener lugar durante largos períodos de tiempo tras la exposición (incluso días) (Yamashita et al., 2004).

b) Exposición a sustancias ototóxicas

Son sustancias que pueden producir alteraciones y/o lesiones en el oído interno o en el sistema vestibular. Suelen ser fármacos, pero también hay otros productos o sustancias químicas que pueden ser lesivos para la cóclea.

Los grupos farmacológicos ototóxicos más importantes son los antibióticos aminoglucósidos, los diuréticos de asa, cis-platino y derivados, ácido acetilsalicílico y quinina. Las alteraciones producidas dependen de la susceptibilidad individual o factores de predisposición genética y ambiental de cada persona y de la dosis administrada, así como la duración de la administración y el momento vital del paciente (Poch-Broto, 1983) (www.ototoxicos.com).

c) Envejecimiento del sistema auditivo: La presbiacusia

El término presbiacusia implica la pérdida auditiva causada por cambios neurodegenerativos producidos con la edad en humanos. Conocemos a esta patología como pérdida auditiva aso-

ciada a la edad (age-related hearing loss = ARHL) en el resto de los mamíferos y animales de experimentación. Esta pérdida es progresiva y está determinada, como en otras enfermedades por la predisposición genética y los factores ambientales, el clima, la dieta, así como el estrés al que estemos sometidos (Schuknecht y Gacek, 1993; Nador, 2010).

Se define como presbiacusia a la pérdida auditiva que se produce de forma lenta, progresiva, bilateral y simétrica asociada al envejecimiento y que comienza por las altas frecuencias, con un incremento del umbral auditivo, afectando progresivamente a medias y bajas frecuencias (Schuknecht y Gacek, 1993). En animales de experimentación, los potenciales auditivos también muestran un incremento en la latencia y una disminución de la amplitud progresivos con la edad (Bartolomé et al, 2002; 2009; Castillo et al., 2006; Castillo, 2003), indicativo de ARHL.

c.1) Tipos de presbiacusia (Formas anatomoclínicas)

En 1891 Zawaardemaker describió ya las manifestaciones clínicas de la sordera asociada a la edad y posteriormente, otros autores las dividieron en patología neural o sensorial (Nador, 2010), pero fue Schuknecht en 1964, quien clasificó por primera vez los cuatro tipos de presbiacusia diferentes:

- **Sensorial:** Caracterizada por una atrofia del órgano de Corti. Se produce una degeneración y posterior pérdida de células ciliadas, que comienza en la base de la cóclea. Degeneran primero las células ciliadas externas y posteriormente las células ciliadas internas (Castillo, et al., 2006) hasta quedar el órgano de Corti colapsado, con la formación de un epitelio de aspecto cuboidal en el que no se aprecian tipos celulares concretos (Maestre, 2002). En ratones C57BL/6, esa “cicatriz” es positiva al marcaje con Galectina-1, (GAL-1) una lectina que se une exclusivamente a células epiteliales en el oído interno. (Bartolomé et al, 2001). Al comenzar por la base, la pérdida auditiva por lo tanto, se detecta en las frecuencias más agudas (entre 4.000 y 8.000 Hz), afectando de manera progresiva también a las más graves (Schuknecht y Gacek, 1993).
- **Neural:** Se produce una degeneración y desaparición de neuronas progresiva desde los ganglios espirales basales (Schuknecht y Gacek, 1993) lo que conlleva una pérdida de señal bioeléctrica para el resto de las neuronas de la vía auditiva, que en consecuencia, al no tener ese impulso degeneran también. Este tipo de presbiacusia presenta gran

afectación en la inteligibilidad del lenguaje (Flores et al., 2015). Algunos autores diferencian un tipo de presbiacusia Central, que engloba solo la pérdida neural de las vías auditivas centrales, mientras que la presbiacusia neural sería en la que solo se ve afectado el ganglio espiral de la cóclea. Se presenta en pacientes con problemas de la comprensión auditiva del lenguaje, pero que mantienen buenos umbrales auditivos en las audiometrías tonales (Welsh et al., 1985; Ouda et al., 2015). Este hecho, se correlacionan con la pérdida y degeneración de neuronas (Ouda et al., 2015) que se produce en los núcleos de la vía auditiva, que muestran signos de necrosis, hinchamiento y apoptosis (Welsh et al., 1985).

- **Metabólica o Vascular:** Debida a la atrofia de la estría vascular, y a la degradación de los pequeños vasos que llegan a ella y al limbo espiral (Johnsson y Hawkins, 1972). Se produce fundamentalmente en las espiras medias y apicales de la cóclea en donde aparecen depósitos basofílicos (Schuknecht y Gazez, 1993; Gratton et al., 1997). Esta anomalía causa desequilibrio iónico en la endolinfa, lo cual afecta gravemente al potencial endococlear (Gil-Loyzaga y Carricondo, 2013). Se produce una pérdida por igual en todas las frecuencias, teniendo el paciente un perfil audiométrico plano. Ocurre de manera muy esporádica, muchas veces asociado a familias y puede ser un fenómeno transitorio (Hawkins, 1973) con más prevalencia en mujeres (Gil-Loyzaga y Carricondo, 2013).
- **Mecánica o Conductiva:** Degeneración y atrofia de las fibras elásticas de la membrana basilar y del ligamento espiral. Se producen depósitos de Ca^{2+} y de lípidos que engrosan la membrana y causan rigidez, con una consecuente pérdida de fibrocitos desde la parte más apical hasta la base de la cóclea (Schuknecht, 1964) y dando lugar a una mayor impedancia, que causa problemas en la transmisión de la onda viajera por la membrana basilar (Gil-Loyzaga y Carricondo, 2013). Es el llamado fenómeno de “elastosis”, presente también en otros procesos de envejecimiento (Ciges et al., 1999).

Otros cambios asociados: Se han encontrado cambios funcionales asociados al envejecimiento en otras estructuras de la cóclea, que podrían influir en la evolución de la presbiacusia en el receptor auditivo. Disminución de la elasticidad de la membrana timpánica o deterioro de los ligamentos de la cadena osicular (Maestre, 2002).

En la mayoría de los casos la presbiacusia presenta las cuatro variantes asociadas de forma aleatoria y posiblemente sea el resultado de la patología generalizada de todas ellas en distinto grado de alteración. En la clínica existen las llamadas presbiacusias mixtas, en las cuales se incluyen pacientes que cumplen las características de más de una alteración de las estructuras periféricas (Johnsson y Hawkins, 1972) y centrales.

c.2) Factores genéticos de la presbiacusia

Existe evidencia de factores hereditarios en la transmisión de la presbiacusia, puesto que se ha descrito la predisposición familiar hacia la hipoacusia, como la hay en otras patologías (Gil-Carcedo et al., 1999; Maestre, 2002). El 50% de las hipoacusias neurosensoriales congénitas son de origen genético y de éstas, aproximadamente el 30% son sindrómicas, es decir que se asocian a algún síndrome y hay más de 700 síndromes que llevan asociada una sordera. Por otra parte, el 70% de las sorderas congénitas no son sindrómicas y en los últimos años se han encontrado más de 54 genes en humanos, implicados en alguna forma de sordera (Gómez-Serrano et al., 2016).

El ARHL depende tanto de factores intrínsecos como extrínsecos. Se ha investigado mucho sobre los factores y mutaciones genéticas, que se pueden dividir en tres áreas según sus efectos (Uchida et al., 2014):

- **Genes monogénicos que causan discapacidad auditiva asociada a la edad con fenotipo similar al ARHL:** Por ejemplo el gen DFNA 9, que causa presbiacusia muy precoz, que comienza a los 20 años de edad (Pauw et al., 2011), el gen DFNA22, que causa un defecto en la miosina VI, necesaria para el desarrollo de los estereocilios y su función o el DFNB15, que produce alteraciones en el receptor 7 de glutamato (mGluR7) (Friedman et al., 2009) y contribuye a los efectos de la excitotoxicidad y aumenta su factor de riesgo (Luo et al., 2013). También DFNA2, que causa una alteración de los canales de K^+ , alterando el ciclo de captación, necesario para mantener el potencial endococlear de las células ciliadas (Kubisch et al., 1999).
- **Genes Involucrados en el estrés oxidativo, estrés biológico y disfunciones mitocondriales:**

Desde hace varias décadas se sabe que el estrés oxidativo juega un papel fundamental en el envejecimiento, ya que durante la fosforilación oxidativa que tiene lugar en la mitocondria

se generan especies oxígeno reactivas (ROS) y radicales libres, que producen daño en el ADN mitocondrial (mtDNA). La acumulación de mutaciones a lo largo de la edad en el mtDNA puede producir daños y disfunción a nivel mitocondrial, causando pérdida auditiva neurosensorial cuando se ven afectadas por este proceso las células del receptor auditivo (Afanasev, 2010; Yamasoba et al., 2013).

Hay dos enzimas que regulan el exceso de radicales libres, y que también pueden ser objeto de mutaciones (Kopke et al., 1999; Carlsson et al., 2005; Bared et al., 2010; Angeli et al., 2012):

- Enzimas que regulan el glutathione (GSH): Glutathione peroxidasa, glutathione reductasa, s-transferasa.
- Enzimas involucradas en la regulación de los aniones superóxido y el peróxido de hidrógeno (Catalasa, Superóxido dismutasa, etc.).

- **Genes involucrados en el envejecimiento y la neurodegeneración:**

El gen APOE, que regula la expresión de la apolipoproteína E, implicada en el transporte de lípidos y su metabolismo, el gen MTHFR, esencial para el metabolismo del folato (Rozen, 1997; Martínez-Vega et al., 2016), el gen EDN1, que expresa endotelina 1, un potente péptido vasoconstrictor, muy abundante en el tejido vascular y en concreto en el sistema nervioso y que se encuentra también en la cóclea, en la arteria espiral modiolar, estría vascular y ganglio espiral (Xu et al., 2007; 2008). O mutaciones en el receptor Gamma de estrógenos ESRRG, ya que se han estudiado los efectos de esta hormona como regulador-protector de la función auditiva en varios estudios con hembras (Hultcrantz et al., 2006; McCullar y Oesterle, 2009; Tremere et al., 2012).

Los modelos experimentales empleados para el estudio de la presbiacusia se han desarrollado con alguna mutación asociada a alguno de estos tres tipos de genes para presentar una patología auditiva asociada a la edad equivalente a la humana. En este sentido, los ratones C57BL/6 presentan una pérdida auditiva de alta frecuencia y degeneración citoestructural basal de la cóclea muy precoz, debida en parte, a una mutación en el gen de susceptibilidad ARHL (Ahl), que codifica para la caderina 23, que se expresa en los estereocilios de las células ciliadas (Wong y Ryan, 2015; Bowl y Dawson, 2015).

A diferencia de otros ratones empleados en estudios de envejecimiento, como los ratones CBA cuyo receptor auditivo, presenta una pérdida auditiva asociada a la edad de 18 meses, los ratones C57BL/6 presentan una degeneración auditiva mucho más rápida, que comienza a los 3-6 meses de edad (Bowl y Dawson, 2015), mientras que en este último caso, el cerebro aun permanece joven. Esta característica, permite aislar la patología del receptor auditivo de las patologías asociadas al envejecimiento en el SNC y correlaciona mejor con los problemas de percepción del lenguaje que suceden en las presbiacusias humanas relacionadas únicamente con el envejecimiento del receptor auditivo (Frisina, et al., 2011).

Son un modelo experimental ideal para el estudio del envejecimiento en el receptor auditivo y por ese motivo han sido empleados con este propósito en las últimas décadas (Castillo et al., 2006).

c.3) Factores ambientales de la presbiacusia

De todos aquellos factores ambientales que pueden estar influyendo en el desarrollo de las hipoacusias del anciano, el más estudiado es el ruido. Siendo los sujetos expuestos a condiciones de ruido, aquellos que la desarrollarán de manera más precoz y de mayor gravedad. En las últimas décadas cada vez se le concede más importancia a todos aquellos factores que actúan sobre nuestro material genético, expresando e inactivando genes (Dong et al., 2014).

También existen determinados factores ambientales que pueden alterar la expresión de uno o varios genes. Esto es lo que se conoce como epigenética y se produce por una serie de acetilaciones y/o metilaciones que bloquean la expresión de algunos genes, interaccionando con las histonas en las que se enrolla la doble hélice de ADN (Gómez-Serrano et al., 2016).

De esta forma cada vez hay un mayor porcentaje de hipoacusias de individuos que, durante su maduración o envejecimiento, y con una cierta predisposición genética, expuestos al factor ambiental, desarrollan finalmente la patología auditiva.

c. 4) Evolución y tratamiento de la presbiacusia

No existe regeneración de forma natural en el receptor auditivo, ya que tanto las células sensoriales, como las neuronas no sufren mitosis y por tanto la pérdida celular en la presbiacusia es un proceso irreversible y progresivo, que hoy en día carece de tratamiento, únicamente son útiles las prótesis auditivas, medidas de protección, así como evitar la exposición

al ruido en la medida de lo posible, vitaminas antioxidantes, o el entrenamiento auditivo (Martínez-Vega, et al., 2016; Castillo, 2006).

c.5) Etiopatogenia: Origen y mecanismos de la patología

Hay mucha discrepancia en cuanto a cuáles son las variables más relacionadas con la aparición y el desarrollo de la presbiacusia. Por ejemplo, hay estudios que encuentran una mayor prevalencia de la presbiacusia en las mujeres (Ferré Rey et al., 2002) y otros que sin embargo, han observado que éstas tienen umbrales más bajos que los hombres, pero solo en las frecuencias agudas 3-8 KHz. (Schuknecht, 1964; Nador, 2010). En general, se ha detectado, como una patología más frecuente en varones y se da a partir de los 60 años, aunque desde mucho antes se evidencia una clara disminución de la audición que pasa desapercibida (Maestre, 2002). La presbiacusia es la tercera enfermedad crónica más prevalente en personas mayores tras la hipertensión arterial y la artritis. Se estima una prevalencia global de un 30% de la población mayor de 65 años y un 63% en adultos mayores de 70 años, según el instituto nacional de EEUU (Álvarez de Cózar, 2013). En Europa, el 30 % de los hombres y el 20% de las mujeres presentan una pérdida auditiva de unos 30 dB o más, por encima de los 70 años de edad (Ouda et al., 2015). En la presbiacusia precoz, el deterioro comienza a partir de los 40-50 años y se desarrolla con gran rapidez (Ciges et al., 1999).

Durante el envejecimiento, se ha evidenciado que las células sensoriales del receptor no se regeneran una vez que se han perdido (Bartolomé et al., 2001) y hoy, sabemos que las células están programadas genéticamente para morir en un proceso que se conoce como “apoptosis” (Dong et al., 2014), pero que la muerte celular es un mecanismo de seguridad para evitar la senescencia. Así cuando la célula está vieja o deteriorada, muere por apoptosis para ser sustituida por otra joven, que ocupará su lugar y realizará sus funciones. En la pérdida auditiva asociada a la edad, la célula al morir no será sustituida por otra (Ciges et al., 1999), deteriorándose paulatinamente la función sensorial por medio de mecanismos “programados” desde que nacemos.

d) La apoptosis:

Los organismos pluricelulares sufren mecanismos de muerte celular programada o apoptosis con varios objetivos: la reorganización y homeostasis tisular durante el desarrollo, mecanismos

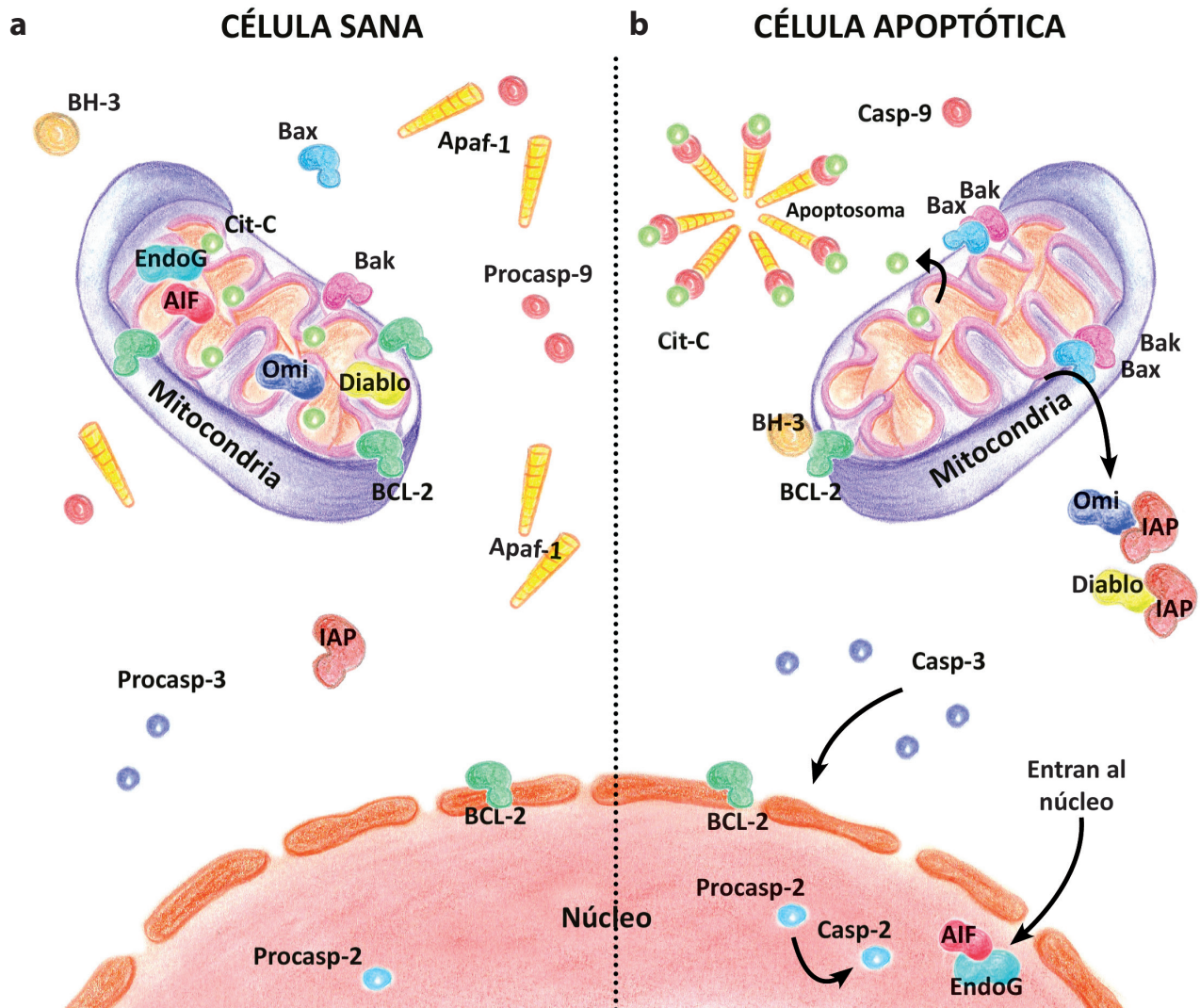


Figura 9: Apoptosis. a: Esquema del citosol de una célula sana. En la célula sana Bcl-2 se encuentra adherido a las membranas de los orgánulos celulares, y más específicamente a la membrana de la mitocondria, protegiendo su integridad. En el interior de la mitocondria encontramos retenidas varias macromoléculas, Diabolo, Omi, AIF, EndoG y entre ellas también el citocromo C. Bax, IAP y BH-3 se sitúan libres en el citoplasma celular, mientras que Bak está adherido a la membrana mitocondrial. Las caspasas permanecen en su forma inactiva, como procaspasa 3 y 9, en el citosol, mientras que procaspasa 2 se sitúa en el interior del núcleo celular. El apoptosoma no está formado y las moléculas de Apaf-1 se encuentran libres en el citoplasma. **b: Esquema de la apoptosis vía mitocondrial.** En esta situación BH-3 se unirá a Bcl-2, impidiéndole mantener la membrana mitocondrial intacta, de forma que Bax se unirá a Bak y formará poros en la pared mitocondrial. Por estos poros saldrán las macromoléculas del interior mitocondrial, Omi y diabolo, se unirán a IAP en el citosol, mientras que AIF y EndoG entrarán en el núcleo de la célula, activando junto con la caspasa 2 activa, la desestructuración del ADN en el interior. La salida del citocromo C de la mitocondria, provoca la activación de Apaf-1 y su unión en heptámeros, para dar lugar al apoptosoma. El apoptosoma unirá caspasa 9, que se activará con moléculas de citocromo C y convertirá a la caspasa 3 en efectora, que junto a la caspasa 7, producirán también la desestabilización del núcleo y el ADN de su interior, lo que finalizará con la muerte de la célula.

de defensa mediados por el sistema inmune, así como la protección frente a diversas enfermedades degenerativas o patologías (Adams, 2003). Además de estos procesos, la apoptosis puede tener lugar como pérdida efectiva de células durante el proceso de envejecimiento.

En el oído interno, las células también pueden sufrir procesos de muerte celular o apoptosis. La pérdida de células puede deberse a procesos ototóxicos, infecciosos, o al envejecimiento del receptor auditivo o presbiacusia. Durante estos procesos, las células ciliadas y las neuronas se van perdiendo por apoptosis funcional, al no existir activación, no hay posible regeneración o re-innervación por parte de las dendritas de las neuronas del ganglio espiral. Estudios en el sistema auditivo en ratones envejecidos, han demostrado que la apoptosis es la principal causa de muerte celular durante la presbiacusia (Falah et al., 2016).

Asociada a cada tipo de afectación, la muerte celular en el oído puede ser de dos tipos: Apoptosis y necrosis:

- La **apoptosis** es una muerte celular programada endógena. Es un proceso altamente regulado, mediado por caspasas, en el que se produce un encogimiento de la célula, que mantiene sus membranas intactas, genera cuerpos apoptóticos y condensa la cromatina. En este proceso se produce la degradación del ADN. Suele darse en células aisladas de un tejido, que mantienen unos niveles de ATP normales. La apoptosis tiene un papel fundamental en la regulación de la organogénesis durante el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la homeostasis celular en los organismos adultos (Nicotera et al., 2003; Tadros et al., 2008).
- La **necrosis** sin embargo, es un proceso agudo, no fisiológico, producido por una lesión o agresión externa, como puede ser el aumento desproporcionado de la concentración de GMS en la cóclea, que se produce durante el trauma acústico. Durante este proceso se hinchan las células y sus orgánulos, en concreto el retículo endoplásmico y las mitocondrias, disminuye el ATP celular, se rompen las membranas celulares con la consecuente pérdida de sustancia intracelular, y se llega finalmente a lisis celular. Se da en sectores del tejido, normalmente asociado a edema e inflamación (Nicotera et al., 2003; Tadros et al., 2008).

La apoptosis en las células está mediada por caspasas. Las caspasas son una familia de cisteín proteasas con residuos de aspartato. Cada célula puede expresar varias de estas proteínas durante su vida, pero permanecen en el citosol celular como zimógenos inactivos o procaspasas hasta que se produce su activación por dimerización. Hay dos tipos de caspasas, las iniciadoras (8, 10, en humanos), 9, 11 y 12) y las efectoras (Caspasas 1, 2, 3 y 7) que al activarse generan una cascada de reacciones que conllevan la muerte de la célula (Adams, 2003).

La apoptosis puede activarse por dos vías diferentes, pero todas conllevan la muerte de la célula, que finaliza con la desestructuración y degradación por fragmentación del ADN nuclear y la consecuente destrucción de la célula. Las dos vías apoptóticas son:

La vía Extrínseca o de los receptores de muerte celular: Está mediada por una respuesta inflamatoria en la que se activa el receptor CD95 (TNF-alfa: Factor Necrosis Tumoral) o FasL (Fas ligando) (Zheng et al., 2014), este receptor de membrana tiene una cola intra-citoplásmica, que cuando se activa, cambia su estado conformacional y se asocia a FADD (o Fas: Factor asociado al dominio de Muerte), al que se une un ligando, que activa la Procaspasa 8 presente en el citosol y la transforma en la Caspasa 8 (Adams, 2003). Cuando se activa la caspasa 8, se activa la Procaspasa 3, transformándola en Caspasa 3. Y por otra parte, activa a Bid (Falah et al., 2016) para que se una a Bcl-2, presente en las membranas de los orgánulos (mitocondria, retículo endoplásmico y núcleo) y que las estabiliza. Bid se activa por Caspasas 1 y 2 y al unirse a Bcl-2, lo bloquea y se activa Bax, que se unirá a la membrana mitocondrial, permeabilizándola al desestructurarla y activando así la vía mitocondrial de la apoptosis (Zheng et al., 2014).

La vía Intrínseca o mitocondrial (Fig. 9): En este proceso se libera al citosol una cascada de señalización de proteínas, provenientes de la mitocondria, que median la respuesta apoptótica.

Se inicia cuando BH3, presente en el citosol, se une a Bcl-2, localizado en las membranas de los orgánulos celulares y lo bloquea. Bcl-2 pertenece a una familia de proteínas responsable de la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial durante la apoptosis (Falah et al., 2016). Los miembros de la familia de Bcl-2 en mamíferos interactúan con al menos tres grupos que comparten como mínimo, un dominio homólogo a Bcl-2 (BH) (Adams, 2003). Se pueden dividir en tres subfamilias y en proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas (Falah et al., 2016):

- Subfamilia Bcl-2 (anti-apoptótica): Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, MCL-1, BCL2A1, BCL-B
- Subfamilia Bax (pro-apoptótica): Bax, Bak, Bok
- Subfamilia BH3 (pro-apoptótica): Bad, Bid, Bik, Blk, BimL, PUMA, NOXA, BMF, HRK

La asociación de los miembros de la familia de Bcl-2 con orgánulos es importante para su función. Bcl-2 está integrado en la membrana externa mitocondrial, pero también se encuentra en el citosol celular, el retículo endoplásmico y en la membrana nuclear en las células (Adams,

2003). Bax es predominante en el citosol en células sanas, pero durante la apoptosis sufre un cambio conformacional que modifica sus terminales, y se transloca a la membrana mitocondrial externa. Bak está presente en la membrana mitocondrial, donde forma largos complejos, que se ha observado que puede permeabilizar la membrana, permitiendo el paso de citocromo C y de moléculas apoptóticas (Adams, 2003). Mientras que Bax/Bak promueven la activación de las caspasas, Bcl-2 inhibe la activación de las caspasas, previniendo la activación por Bak/Bax (Adams, 2003).

Bcl-2 presente en la membrana mitocondrial externa, la mantiene estable, pero cuando se le une BH3, lo bloquea, y Bax y Bak, se unirán a la membrana mitocondrial, generando poros en ella, por los que saldrán moléculas desde el interior de la mitocondria. Entre ellas sale el citocromo c, que se va a unir a la molécula Apaf-1 (apoptotic protease activating factor), presente en el citosol celular, y que activa a la procaspasa 9, para formar un complejo citosólico heptamérico llamado apoptosoma o cuerpo apoptótico, con la caspasa 9. El apoptosoma va a activar la procaspasa 3, para formar Caspasa 3 activa. Junto a la caspasa 7, la 3, inicia la proteólisis para activar la DNasa (CAD/DFF40), que escinde la cromatina nuclear (Adams, 2003; Du et al., 2015a). La relación Diablo/Smac y Omi/ Hrt2 incapacita las IAPs (proteínas de inhibición de apoptosis) en el citosol, haciendo que AIF y la Endonucleasa G entren al núcleo, y ayuden a la degradación del ADN. (Adams, 2003) La activación de caspasa 3, genera activación de otras proteínas presentes en el citoplasma, que pasarán al núcleo, como las Endonucleasas, (Endonucleasa G o AIF) que con la ayuda de otras caspasas, como la caspasa 2, escindirán el ADN nuclear. Otras, como Omi o Diablo, se van a unir a IAP en el citoplasma (Frisina et al., 2016; Adams, 2003) y degradarán además las proteínas del citoesqueleto de la célula (Frisina et al., 2016).

La vía intrínseca implica a su vez, estrés oxidativo y la formación de especies oxígeno reactivas (ROS), que causan daño en las membranas y activación de la vía de las MAP Kinasas. Esta vía dañará la membrana mitocondrial (Van De Water y Rybak, 2004), y el retículo endoplásmico. Además de daño en el ADN, y liberación de P53, que se une a la membrana disfuncional, el daño en el retículo endoplásmico causa acumulación de iones de calcio y activación de calpaína que puede activar caspasas o romper lisosomas, liberando catepsinas, que provocarán finalmente el daño en el ADN. Por otra parte, el Ca^{2+} activa a c-Jun y JNK y activa a su vez la vía extrínseca (Tadros et al., 2008).

En este proceso salen cationes de calcio de los reservorios del retículo endoplásmico, favorecidos por la activación de la Procaspasa 12, que se transforma en caspasa 12 (Wang et al., 2015). El transporte del calcio se facilita por la Anexina 5, una proteína del citoesqueleto de la célula, que lo lleva hasta la mitocondria. Esto favorece la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, en la que se forman poros por los que saldrá citocromo c y otras proteínas del interior de la mitocondria, como Endonucleasa G, Diablo, AIF, Omi...etc. Se activa la caspasa 3 y se produce la fragmentación del ADN y la degradación de la célula (Wang et al., 2015) por apoptosis mitocondrial o de vía intrínseca, por medio de la formación del apoptosoma, como se ha descrito con anterioridad.

El retículo endoplásmico (RE) es el segundo orgánulo celular de importancia en la apoptosis inducida por estrés. El estrés en el RE produce alteraciones en la glicosilación, mal plegamiento de proteínas, desequilibrio de la homeostasis del calcio o privación de la glucosa, que provoca un estiramiento de las proteínas. Si esta respuesta se prolonga, induce necrosis o apoptosis. El RE es el principal almacén de calcio de la célula y su flujo, en relacionado con el consumo dentro de la mitocondria y la anexina-5 parece estar relacionada en este proceso. Las células carentes de anexina-5, liberan citocromo c desde la mitocondria y es necesaria esta liberación de calcio desde el RE para que la mitocondria entre en apoptosis. Se cree que Bcl-2 funciona igual en el RE que en la mitocondria y que interrumpe la comunicación con ella por culpa del estrés. Bcl-2 controla Bax en el RE a través de un intermediario que previene su activación (Adams, 2003).

Bak y Bax están implicados en la movilización del calcio desde los almacenes del RE y su consumo dentro de la mitocondria y aparentemente pueden promover su función, activando la caspasa12, que se encuentra en la cara citoplásmica del RE. La vía de activación apoptótica por estrés oxidativo activa típicamente la caspasa-9, pero la respuesta a la citotoxicidad puede requerir que Bax y Bak actúen los dos en el RE para que se segregue calcio y para permeabilizar la membrana mitocondrial externa (Falah et al., 2016).

El estrés oxidativo es un factor importante en enfermedades degenerativas asociadas a la edad, puesto que induce a Bak1. Bcl-2 inhibe la activación de Bak1 uniéndose a ella en las células sanas (Falah et al., 2016) mientras que Bak promueve la muerte celular coclear en respuesta al estrés oxidativo (Someya et al., 2009). La apoptosis es un proceso de muerte celular programa-

da, que está regulado genéticamente y en mamíferos es muy importante durante el proceso de envejecimiento y en la presbiacusia (Du et al., 2015a). Sin embargo, aunque las estrategias para disminuir el estrés oxidativo por medio de suplementos antioxidantes con la dieta han sido convincentes en el caso de la pérdida auditiva por ototóxicos y exposición al ruido, los resultados para la pérdida auditiva asociada al envejecimiento no han mostrado el efecto esperado (Böttger y Schacht, 2013).

Se desconocen aun los aspectos fundamentales de la etiología y fisiopatología de la presbiacusia, pero existen evidencias de que no es un proceso específico sino que podría ser el resultado final de un conjunto de patologías puntuales que acabarían derivando en la hipoacusia final, pero pudiendo iniciarse ésta, desde diversos procesos específicos. De hecho, se han sugerido cambios en las proteínas sinápticas durante el proceso de envejecimiento, como la sinaptofisina (Bartolomé et al., 2009), o cambios en los neurotransmisores de las vías eferentes de la cóclea, tras a la sobreexposición al ruido (trauma acústico), como dopamina (Gil-Loyzaga et al., 1994), GABA, y norepinefrina en las fibras sinápticas (Vicente-Torres y Gil-Loyzaga, 1999), que podrían modular las alteraciones del receptor auditivo.

Los animales con más edad presentan una menor adaptación a los cambios fisiológicos y pueden ser más susceptibles a toxinas y al efecto de la excitotoxicidad producido por neurotransmisores de amino ácidos, en el sistema nervioso periférico y central, sin que afecten a cócleas de animales más jóvenes (Willott et al., 2001).

Hipótesis y objetivos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

La sordera ligada al envejecimiento, la presbiacusia, presenta una serie de características que hacen complicada la determinación de una única etiología concreta que pueda explicar y justificar el inicio y el desarrollo de la patología. De hecho, en la literatura científica está bien descrito que el inicio de este proceso incluye alteraciones tanto en la estría vascular, la membrana tectoria, el proceso de reciclaje del K⁺ de la endolinfa, como en los elementos sensoriales, las células ciliadas del órgano de Corti y las neuronas aferentes del ganglio espiral coclear, cuyos axones forman la porción auditiva del VIII par nervioso, provocando esta sordera de carácter neurosensorial.

En el caso del estudio específico de las alteraciones de las neuronas del ganglio espiral, una de las posibles causas desencadenantes de la pérdida de elementos neuronales característica de la patología podría ser un desequilibrio en el ciclo de liberación-recaptación-reciclaje del GLU en la hendidura sináptica entre la CCI y la dendrita aferente de tipo I coclear. Este desequilibrio provocaría la acumulación de GLU en la sinapsis y el consiguiente inicio del proceso excitotóxico del GLU que llevaría a la degradación de elementos activos neuronales en el ganglio espiral coclear y la consiguiente pérdida auditiva. Este proceso excitotóxico, común a todas las sinapsis glutamatérgicas tanto del SNC como del SNP, podría estar también mediado durante la presbiacusia, por cambios en las dendritas postsinápticas que producirían un aumento en la sensibilidad de la fibra a la neurotoxicidad glutamatérgica, precipitando la afectación neuronal en los primeros momentos de la presbiacusia.

Según esto, la hipótesis que motiva la presente Tesis Doctoral sería que la membrana postsináptica de la dendrita glutamatérgica aferente de tipo-I del ganglio espiral, que contacta con la CCI del órgano de Corti, incrementa su sensibilidad al neurotransmisor nominal de la sinapsis, el GLU, de forma progresiva con la edad, probablemente mediante modificaciones en sus receptores glutamatérgicos NMDA y no-NMDA. Este incremento de sensibilidad al GLU haría que la neurona fuera cada vez más proclive a sufrir episodios excitotóxicos derivados de desequilibrios en el ciclo de reciclaje del GLU en la hendidura sináptica, con lo que acabaría dañándose la neurona y se perderían elementos ganglionares activos implicados en la transmisión de la señal auditiva a las vías centrales. Por ello, este aumento de sensibilidad podría estar relacionado primariamente con el inicio y consecuente progresión de la presbiacusia.

Por otro lado, y posiblemente, de manera simultánea, este proceso podría estar también influenciado por otras partes de la vía auditiva, que también son glutamatérgicas y de las que parten axones que inervan estructuras cocleares, el sistema eferente coclear. También en este nivel del SNC, los procesos excitotóxicos podrían ser, en alguna medida, responsables de un deterioro de la funcionalidad de las neuronas eferentes del COS que, en condiciones normales, tendrían un efecto protector sobre el receptor auditivo modulando la activación de la aferencia de tipo-I, pero que esta situación patológica dejarían de ejercer su función incrementando la posibilidad de afectación de la aferencia primaria del ganglio espiral.

2.2. OBJETIVOS

Atendiendo a la hipótesis formulada para la presente Tesis Doctoral, el objetivo principal a alcanzar sería analizar los efectos de la neurotoxicidad inducida por GLU en diferentes grupos de edad y en ambos sexos, para poder detectar sus diferencias. Para ello se utilizará un modelo experimental de envejecimiento, el ratón C57BL6J, con administración intraperitoneal de GMS para simular las condiciones patológicas de excitotoxicidad neuronal de aumento de GLU en la sinapsis glutamatérgica. A partir de aquí y para valorar la hipótesis se utilizarán diferentes condiciones y aproximaciones experimentales:

- Mediante estudios funcionales de naturaleza electrofisiológica: Utilizando técnicas de registro de potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC) se abordarán los siguientes objetivos secundarios:
 - Determinar los efectos de la neurotoxicidad debida al GMS en ratones C57BL6J de diferentes grupos de edad.
 - Determinar la influencia del sexo sobre los efectos de la neurotoxicidad debida al GMS en diferentes grupos de edad.
 - Determinar la influencia de la fase del ciclo estral de las hembras sobre los efectos de la neurotoxicidad debida al GMS en diferentes grupos de edad.
- Mediante estudios morfológicos: Utilizando técnicas de tinción simple, para determinar los posibles cambios estructurales en la cóclea y el COS derivados de los efectos de las condiciones

experimentales, y técnicas inmunohistoquímicas para detectar la expresión de proteínas marcadoras de diferentes procesos implicados en la patología neurotóxica en la cóclea, se abordarán también los siguientes objetivos secundarios:

- Determinar los cambios morfológicos y estructurales producidos sobre los efectos de la neurotoxicidad debida al GMS en diferentes grupos de edad, tanto en la cóclea, como en el COS.
- Valorar las posibles rutas apoptóticas que tienen lugar en las neuronas del ganglio espiral coclear tras la administración del GMS en diferentes grupos de edad y en ambos sexos.
- Valorar los efectos producidos por administración del GMS en las neuronas Tipo II del ganglio espiral coclear en diferentes grupos de edad y en ambos sexos.
- Valorar la actividad y el metabolismo de las neuronas del ganglio espiral coclear tras la administración de GMS diferentes grupos de edad y en ambos sexos.

Material y métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de la presente Tesis Doctoral, se han utilizado ratones (*Mus musculus*, *L. 1758*) de la cepa C57BL/6, de ambos sexos (74 hembras y 83 machos) distribuidos en 5 grupos experimentales en función de la edad: 1, 3, 6, 9 y 12 meses de edad, y con un peso de entre 15-30g. Todos ellos estuvieron estabulados en el Animalario Central de la Universidad Complutense de Madrid (CAI-UCM), en una habitación con la temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (luz a partir de las 08:00 h) y con libre acceso a agua y alimento. Durante el estudio, el cuidado y uso de los animales estuvieron en estricta conformidad con las normas de bienestar animal de la Declaración de Helsinki.

3.2. GRUPOS EXPERIMENTALES. PROTOCOLO DE NEUROTOXICIDAD: ADMINISTRACIÓN DE GLUTAMATO MONOSÓDICO.

Los animales, cada sexo por separado y previamente asignados a un grupo de edad determinado, fueron divididos, para cada edad en dos grupos de tratamiento, control y glutamato.

1 MES	HEMBRAS	Control
		Glutamato
	MACHOS	Control
		Glutamato
3 MESES	HEMBRAS	Control
		Glutamato
	MACHOS	Control
		Glutamato
6 MESES	HEMBRAS	Control
		Glutamato
	MACHOS	Control
		Glutamato
9 MESES	HEMBRAS	Control
		Glutamato
	MACHOS	Control
		Glutamato
12 MESES	HEMBRAS	Control
		Glutamato
	MACHOS	Control
		Glutamato

Figura 10: Grupos experimentales por edades, sexo y tratamiento

De esta manera, se establecieron los tres factores principales de estudio en la presente Tesis Doctoral: Edad, Sexo y Tratamiento.

Por su parte, el tratamiento utilizado es parte del protocolo de neurotoxicidad auditiva que es ya clásico en nuestro laboratorio (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990; Gil-Loyzaga y cols., 1993; 1999; Carricondo y cols., 2001; 2002; Gil-Loyzaga, 2002). Se trata, en este caso, de la administración intraperitoneal (4g/kg) diaria en dos días consecutivos de la sal monosódica del ácido glutámico, el glutamato monosódico (GMS) (Sigma). A las 24h de la finalización del tratamiento se pasó a

realizar el análisis de la actividad del receptor y la vía auditiva mediante el registro del potencial evocado auditivo de tronco cerebral (PEATC).

3.3. PROCEDIMIENTOS ELECTROFISIOLÓGICOS: EL REGISTRO DEL POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO DE TRONCO CEREBRAL

3.3.1. Material de registro electrofisiológico

La actividad del receptor y la vía auditiva se analizó mediante el registro de los potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC). De toda la batería de pruebas electrofisiológicas disponibles en el campo de la audiolología, se eligieron los PEATC dado que es la prueba más utilizada para este tipo de acercamiento al estado fisiológico del sistema auditivo, es la más estable y la que menos variabilidad interindividual ofrece y, además registra una parte muy sustancial del sistema auditivo.

Para ello, se utilizó un equipo de registro de PEATCs (Mistral SM 280M, Medelec Int.® Woking, England). La señal bioeléctrica del animal fue recogida por medio de tres electrodos intraepidérmicos colocados en la cabeza, de manera que, el electrodo activo y el de referencia se situaron próximos a bulla timpánica ipsi- y contralateral al oído explorado respectivamente, mientras que el electrodo de tierra se colocó en la zona del vértex craneal. Estos electrodos se conectaron al pre-amplificador y de ahí la señal llega al equipo de registro electrofisiológico propiamente dicho, donde se realiza la conversión analógica a digital, el filtrado de la señal mediante los filtros de “paso alto y bajo” para mejorar el registro de la señal y el promediado de las señales para su posterior exposición en pantalla. Los sonidos estimulantes utilizados para generar los PEATCs fueron estímulos de onda cuadrada de tipo “click” que fueron liberados a una tasa de 10 clicks/s. La estimulación auditiva en el animal se realizó en campo cerrado, es decir, los estímulos llegaron directamente al conducto auditivo externo (CAE) del animal para evitar pérdidas de señal sonora en la entrada del oído. Por ello, los estímulos se suministraron por medio de un tubo de PVC de 1,3m cuyo extremo fue introducido directamente en el CAE del animal. Se realizaron registros electrofisiológicos a diferentes intensidades de estimulación para encontrar el umbral auditivo del animal, de manera que se utilizaron estímulos desde 100 hasta

30 dB(SPL), disminuyendo en pasos de 10 dB, previamente calibrados con un sonómetro (Promax[®] 120), y determinando el umbral auditivo del animal como la última intensidad a la que se detectó una actividad neural derivada de la estimulación sonora utilizada. Todo el proceso se realizó en el interior de una cámara anecoica y farádica (Stock[®] S.A.), que ofrece una atenuación de 30 dB(SPL) sobre el sonido externo, permitiendo el aislamiento de ruidos exteriores y de ondas electromagnéticas que podrían interferir en los registros.

3.3.2. Método experimental y de registro de los potenciales evocados auditivos.

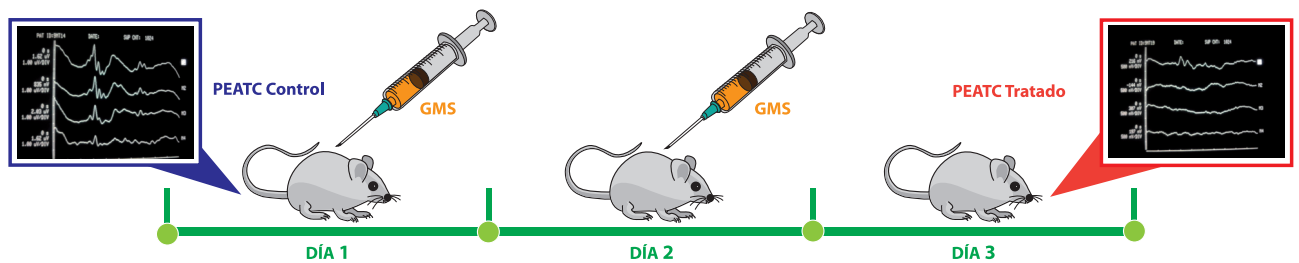


Figura 11: Esquema del diseño del modelo experimental de la presente Tesis doctoral.

Una vez anestesiados por vía intraperitoneal (hidrato de cloral, 8%), los animales fueron introducidos en la cámara anecoica para realizar el registro control previo a la administración del fármaco.

Se realizó el registro de PEATC en ambos oídos para obtener un perfil audiométrico objetivo de cada animal previo al tratamiento. En el tiempo que duró la exploración electrofisiológica, se mantuvo la temperatura corporal del animal de experimentación a 37°C para lo cual se utilizó una almohadilla eléctrica que permaneció apagada durante los registros para no interferir con la señal bioeléctrica. Tras esta primera prueba de PEATC, se le administró al ratón el GMS por vía intraperitoneal y diariamente, durante dos días consecutivos. Al terminar el tratamiento, se volvió a realizar una prueba de PEATC del mismo modo para comprobar los cambios producidos por el GMS.

3.3.3. Obtención de las medidas y procesamiento estadístico

El PEATC representa la actividad eléctrica sincrónica de la vía auditiva circunscrita al tronco cerebral tras el estímulo auditivo. Este potencial es el más estudiado por tener una forma de onda invariante y una gran resistencia a la administración de drogas y a los estados de sueño y vigilia (Allen y Starr, 1978) y se caracteriza por presentar por cinco ondas positivas princi-

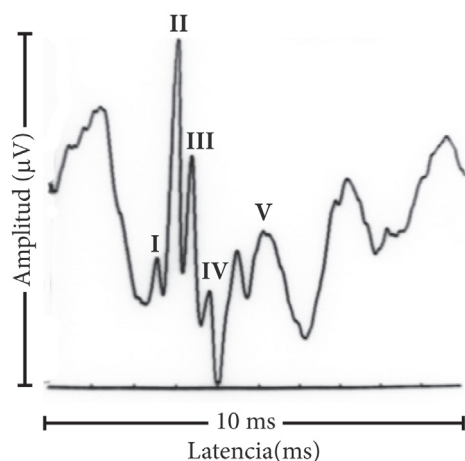


Figura 12: Ejemplo del registro de un potencial auditivos de tronco cerebral en ratón C57BL6J.

pales (Shaw, 1987) numeradas con números romanos y que se corresponden con un generador específico en la vía auditiva (Simón, 1995; Carricondo, 2000). Así:

- Onda I: nervio auditivo
- Onda II: núcleos cocleares
- Onda III: complejo olivar superior
- Onda IV: lemnisco lateral
- Onda V: colículo inferior

De cada uno de los registros del PEATC, uno por cada intensidad sonora y por cada oído, se obtuvieron las medidas de latencia (ms) y amplitud (μV) de cada una de las cinco ondas. Además, tomando como referencia la última onda en desaparecer a medida que disminuye la intensidad del sonido estimulante, que en el caso de los ratones es la onda II, se obtuvo el umbral auditivo para cada oído.

Los datos obtenidos de los registros de PEATC se analizaron mediante el programa estadístico SPSS versión 22.

En el presente estudio se estableció una matriz de datos con estos factores y variables independientes para cada factor:

- Factor “Edad” (5 variables): 1, 3, 6, 9, 12 meses
- Factor “Tratamiento” (2 variables): Control, Glutamato
- Factor “Sexo” (2 variables): Hembras, Machos

Por lo tanto, la matriz de tres factores con diferente número de variables independientes por cada factor sería: “Edad”x”Tratamiento”x”Sexo” con “5x2x2” variables independientes para cada factor. Se estableció la no parametricidad de la muestra y se realizaron los análisis

estadísticos no paramétricos oportunos. Así, El análisis estadístico elegido fue un análisis no paramétrico para muestras independientes con la prueba de Kruskal-Wallis para comprobar el efecto del tratamiento y el sexo, en función de la edad. Y posteriormente, se llevó a cabo la prueba de U de Mann-Whitney para valorar la significación en cada grupo de edad, del efecto del tratamiento y del sexo de forma independiente. Las comparaciones se realizaron para las medidas umbrales (dB) en la onda II, la onda de referencia en los ratones, y de la latencia (ms) y la amplitud (μV) de las ondas I, II y III, hasta la intensidad de 70 dB.

3.4. DETERMINACIÓN DEL ESTADO DEL CICLO ESTRAL. PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE FROTIS VAGINALES

Para conocer la fase en el que estaban dentro del ciclo estral, se realizó un frotis vaginal a todas las hembras, justo antes de la prueba de PEATC control y tras los dos días de tratamiento con GMS, antes de la prueba de PEATC. Para determinar el estadio estral de las ratonas y poner de manifiesto la fase en la que se encontraban en el momento de la prueba, los frotis se tiñeron con la tinción de Papanicolaou y con azul de toluidina como se observa en la figura 13.

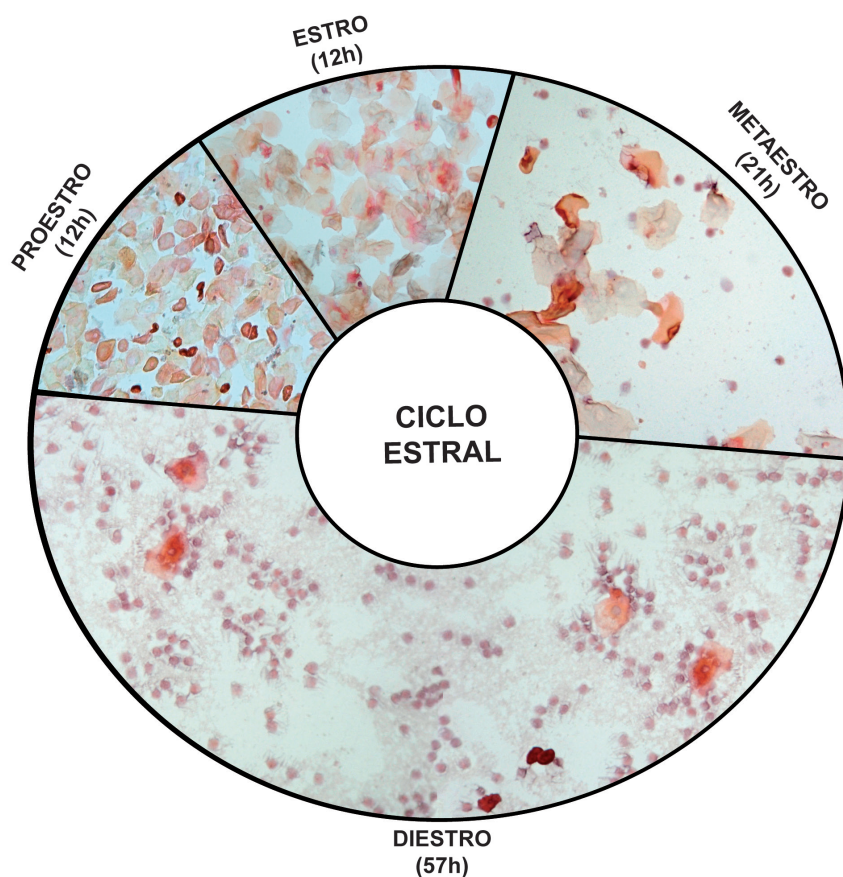


Figura 13: Esquema de microfotografías de las fases del ciclo estral de ratón C57BL6J. Tinción de Papanicolaou de cada una de las etapas del ciclo estral. Fase Proestro: Dura 12 horas. Se observan células epiteliales nucleadas y ausencia de leucocitos. Fase Estro: Dura 12 horas. Las células epiteliales se muestran cornificadas, sin núcleo y también hay ausencia de leucocitos. Fase Metaestro: Dura 21 horas. Lo más característico de esta fase son las células epiteliales cornificadas, pero con la presencia de leucitos. Fase Diestro: dura unas 57 horas y las células epiteliales vuelven a ser nucleadas, con la presencia de numerosos grupos de leucocitos.

6 meses	machos		glutamato
			control
	hembras	proestro-estro	glutamato
			control
		metaestro-diestro	glutamato
			control
9 meses	machos		glutamato
			control
	hembras	proestro-estro	glutamato
			control
		metaestro-diestro	glutamato
			control

Figura 14: Esquema de los grupos experimentales en función de edad, sexo y fase estral y tratamiento

Las 4 fases estrales se agruparon en dos tipos en función de la similitud de los componentes hormonales de cada fase. Se dividieron así en Grupo 1: Estro y Proestro y Grupo 2: Diestro y Metaestro y se clasificó el ciclo de cada hembra, en cada uno de los registros, antes y después del tratamiento.

A partir de aquí, se estableció, de nuevo, la matriz de factores y variables independientes para cada factor, específica para este experimento concreto:

- Factor “Edad” (2 variables): 6 y 9 meses
- Factor “Tratamiento” (2 variables): Control y Glutamato
- Factor “Sexo y Fase Estral” (3 variables): Hembras en Proestro-Estro, Hembras en Metaestro-Diestro y Machos

Por lo tanto, la matriz de tres factores principales con diferente número de variables independientes por cada factor sería: “Edad”x”Tratamiento”x”Sexo-FaseEstral” con “2x2x3” variables independientes para cada factor. Se estableció también la no parametricidad de la muestra y se realizaron los análisis estadísticos no paramétricos de manera independiente y del mismo modo comentado el apartado anterior.

3.5. ESTUDIO MORFOLÓGICO E HISTOLÓGICO

Al finalizar el estudio electrofisiológico y con el animal bajo anestesia profunda, se pasó a la fijación de los tejidos con paraformaldehído (4% en PBS, 0,1M pH 7,4) mediante perfusión intracardiaca. Tras ello, se extrajeron las dos cócleas y el encéfalo para su estudio posterior.

3.5.1. Tratamiento de las muestras para histología

Las muestras se postfijaron en paraformaldehído (4% en PBS, 0,1M, pH 7,4) y se mantuvieron en este fijador hasta su procesamiento e inclusión en parafina.

a) Tratamiento de las cócleas

Para poder realizar cortes histológicos con microtomo de las cócleas es imprescindible decalcificar su parte ósea, tanto interna, el modíolo, como su parte externa, la lámina de los contornos. Para ello se mantuvieron durante al menos una semana en ácido ascórbico (1% en NaCl al 0,9%), que con cambios diarios, actúa como quelante de cationes de Calcio, ablandando la muestra, tras lo cual puede ser cortada con micrótopo. (Merchán-Pérez. 1999).

Posteriormente las cócleas se incluyeron en parafina. La parafina, líquida a 65 °C y sólida a temperatura ambiente, permite mantener los tejidos preservados en su interior y facilita su manejo para el corte de las muestras histológicas, pero es un medio hidrófobo, y por ello, las muestras deben ser deshidratadas con alcoholes crecientes, desde 35°, 50°, 70°, 95° y 100° hasta llevarlas a un medio miscible con la parafina, como el tolueno, en el que la muestra se encontrará completamente deshidratada y que le da más consistencia para facilitar el corte una vez que las muestras están embebidas en el bloque de parafina.

Las cócleas para esta tesis se han seccionado en cortes de 7 µm de espesor (microtomo Leica RM 2135), para obtener series de 10 con 6-8 cortes por portaobjetos de vidrio y uno de cada muestra se tiñó con una tinción simple de hematoxilina-eosina para determinar la calidad del tejido.

b) Tratamiento del Sistema Nervioso Central

Tras la postfijación las muestras del sistema nervioso central se tallaron con el fin de seleccionar el área del tronco cerebral donde se sitúa el complejo olivar superior (COS). Posteriormente, se deshidrataron en alcoholes crecientes para su inclusión en bloques de parafina por medio del mismo proceso descrito para las cócleas, pero al ser un trozo de tejido de mayor tamaño, los tiempos de inclusión entre los distintos alcoholes, así como en el tolueno y la parafina, deben ser mayores también.

Los bloques de parafina de las muestras de SNC se seccionaron (microtomo Leica RM 2135) en cortes de 7mm de grosor. Los cortes obtenidos fueron distribuidos, de manera seriada, en

portaobjetos de vidrio y uno de cada muestra se tiñó con una tinción simple de violeta de Cresilo para determinar la calidad del tejido nervioso.

3.5.2. Inmunohistoquímica

La detección de los diferentes antígenos (Ag) objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, se realizó mediante técnicas de detección inmunohistoquímica de visualización indirecta con anticuerpo secundario (Ac-II) biotinilado.

Los Ac primarios (Ac-I) específicos elegidos para el estudio de los cortes de cóclea fueron:

- Anti-Enolasa2 (1:100, Novus Biologicals ,3H11, monoclonal, hecho en ratón)
- Anti-Neurofilamentos 200 (neurofilamentos 200kDa, Sigma, 1:100, hecho en conejo)
- Anti-Bcl-2 (1:100, Novus Biologicals, 8E12, monoclonal, hecho en ratón)
- Anti-BAX (1:100, Novus Biologicals, policlonal, hecho en conejo)
- Anti-Caspasa 3 (1:100, Novus Biologicals, NB600-1235, policlonal, hecho en conejo)
- Anti-Caspasa 9 (1:100, Biorbyt, orb1677, policlonal, hecho en conejo)

Así, tras la hidratación de los cortes de parafina, se realizó una inhibición de las peroxidasas endógenas del tejido mediante la incubación de las muestras durante unos minutos con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para evitar que su actividad pueda confundirse con la actividad propia de la peroxidasa que se utilizará para visualizar la reacción Ag-Ac. Posteriormente, se realizó otra incubación con el suero del animal del que se extrae el Ac-II, para evitar su unión inespecífica en el tejido, junto con un detergente (Tritón-X100, Sigma-Aldrich) para permeabilizar la membrana plasmática y permitir el acceso de los productos al interior de la célula.

La detección del Ag deseado se realiza mediante la incubación de la muestra con el Ac-I específico (24h, 4°C y oscuridad), tras lo cual, las muestras se lavaron con PBS (0.1M, pH 7.4) y se incubaron con el Ac-II biotinilado (1:200, 1h, temperatura ambiente y oscuridad). El Ac-II se unirá específicamente al Ac-I para amplificar la reacción Ag-Ac-I.

Los Ac-II están biotinilados para permitir la unión de estos con el complejo avidina-biotina. Este complejo contiene una peroxidasa, que cataliza la liberación de oxígeno, a partir de H_2O_2 ,

que afectará a un sustrato oxidable, la diaminobencidina (DAB), incluida en la última solución de incubación del proceso. La DAB oxidada es insoluble en agua y precipita sobre el complejo Ag-Ac. Así, el precipitado resultante de este proceso, de color marrón-rojizo, evidencia la reacción Ag-Ac en el tejido y por tanto hace patente la localización del antígeno en la célula.

Todo el material fotográfico presentado en esta Memoria de Tesis Doctoral se ha realizado con un fotomicroscopio (Leica, Leitz DMRB) y una cámara digital incorporada al mismo (Nikon DS-Fi1, Digital Sight DS-U2).

Resultados

4. RESULTADOS

Los resultados de la presente Tesis Doctoral se dividen en dos bloques claramente diferenciados. Por una parte, se exponen los datos de los registros electrofisiológicos obtenidos de las pruebas de PEATC y por la otra, se presentan los resultados morfológicos de las tinciones de cóclea con hematoxilina-eosina y de la vía auditiva con violeta de cresilo y las detecciones de inmunohistoquímica realizadas en cócleas de los distintos grupos de edad, sexo y tratamiento.

4.1. RESULTADOS ELECTROFISIOLOGÍA

En los resultados de electrofisiología se observan gráficas, obtenidas de medir la latencia (ms) y amplitud (μ V) de las ondas de PEATC a las intensidades de 70, 80, 90 y 100dB.

Las ondas del registro de PEATC, como se observa en la figura 15, se retrasan (latencia) y disminuyen su tamaño (amplitud) hasta un nivel umbral, en el que no se produce respuesta bioeléctrica detectable por el equipo y se pierde la onda de referencia, que en el caso de los roedores, es la onda II, como se señala en la figura 15. Una disminución de la amplitud de las ondas, y un aumento de la latencia pueden estar relacionados también con el desarrollo de presbiacusia en el anciano u otras patologías como la excitotoxicidad, indicando la existencia de una pérdida auditiva, asociada a la edad, el tratamiento con GMS y/o el sexo de cada caso.

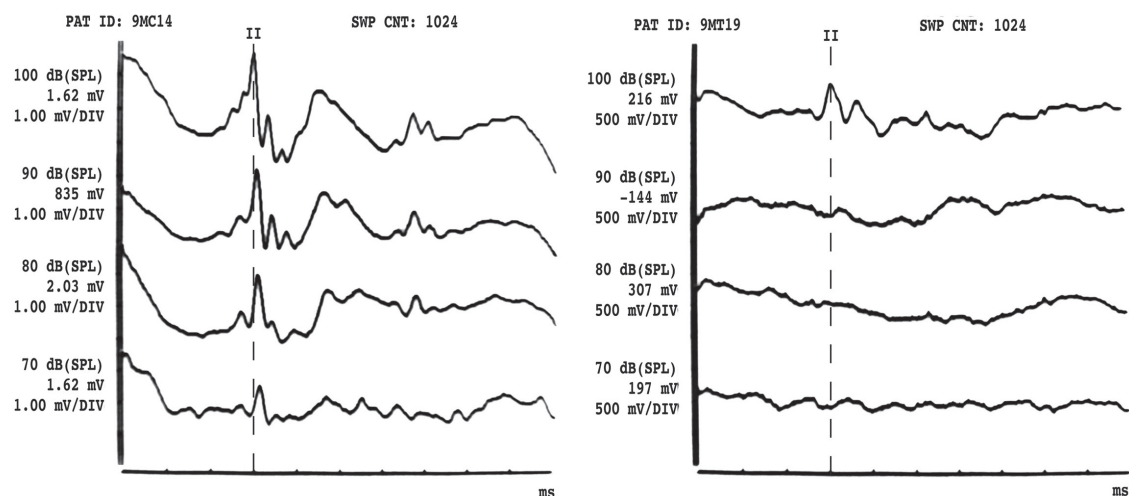


Figura 15: Registros de ondas de PEATC. De arriba a abajo disminución de la intensidad en pasos de 10 dB (SPL). Izquierda: Animal control. La barra discontinua representa la onda II por ser la onda de referencia de umbral auditivo en el ratón. Derecha: Animal tratado dos días con GMS.

4.1.1. Estudio del efecto de la edad

El efecto principal de la edad en la variabilidad de la muestra es muy significativo, de manera que en conjunto y sin tener en cuenta a los demás factores, se puede decir que hay diferencias significativas entre los 5 grupos de edad y en todas las ondas del PEATC a las intensidades de estímulo estudiadas. Así, en las tres primeras ondas de los PEATC el efecto principal de la edad en todos los animales es muy significativo ($p\text{-valor} \leq 0,001$) para las intensidades analizadas: 70, 80, 90 y 100dB.

En general, en todas las gráficas se observa que a los 9 y 12 meses de edad los animales presentan una latencia mayor y menores valores de amplitud para todos los grupos de tratamiento y de sexo. Sin embargo, los grupos de animales comprendidos entre 1 y 6 meses presentan latencias y amplitud similares pero con variaciones respecto a las distintas condiciones a estudiar. Esas condiciones se evaluarán en los siguientes análisis para cada efecto en particular de sexo, edad y tratamiento.

Efecto de la combinación de tres factores “EDAD x TRATAMIENTO x SEXO”

Cuando se estudia el efecto de la edad en cada grupo experimental, se observa de nuevo el mismo efecto muy significativo de la edad en los registros del PEATC. Así, a medida que el animal va envejeciendo la amplitud de las ondas va disminuyendo y la latencia va incrementándose. En el grupo de machos, el tratamiento con GMS provoca unos valores de latencia superiores y de amplitud inferiores de la onda I del PEATC, respecto a los grupos control de referencia. En cuanto a los resultados en los grupos de hembras, se observan también parámetros de aumento de latencia y disminución de la amplitud de la onda I del PEATC, pero aparentemente de menor entidad que en el caso de los machos.

Estudio del efecto de la edad

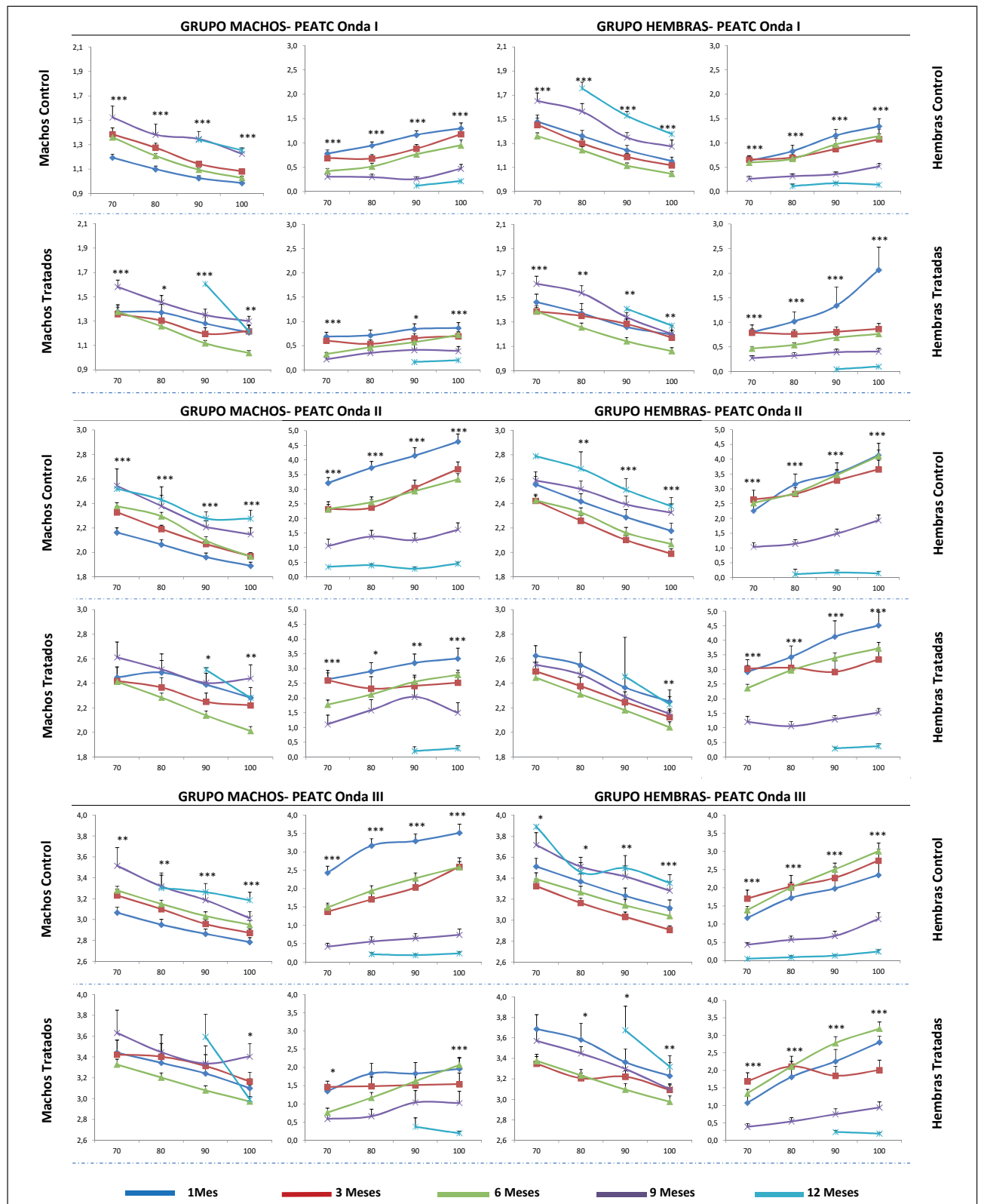


Figura 16: Efecto de la edad: Onda I. Representa la actividad del ganglio espiral coclear. **Onda II.** Representa la actividad del núcleo coclear y **Onda III.** Representa la actividad del complejo olivar superior. Se exponen los resultados de los efectos producidos por la edad en los grupos de machos (izquierda), y los grupos de hembras (derecha) en el grupo de hembras y machos controles y tratados (abajo). Se representa la latencia (ms) y amplitud (μV) de las ondas I, II y III del PEATC, para las intensidades de 70, 80, 90 y 100 dB(SPL) en los distintos grupos de animales. P-Valor > 0.05 = NS; * = 0,05 > P-Valor > 0.01 ; ** = 0.01 > P-Valor > 0.001 ; *** = 0.001 > p-Valor.

4.1.2. Estudio del efecto del factor sexo

Se ha estudiado el efecto del sexo en función del tratamiento para cada grupo de edad. En general, el comportamiento de los registros de hembras y machos es similar en todas las condiciones experimentales sin presentar muchas diferencias significativas entre ambos sexos. En este sentido, la latencia de las ondas I, II y III, en el grupo control de 1 mes presenta diferencias muy significativas entre hembras y machos ($p\text{-valor} \leq 0,001$). También la amplitud para el mismo grupo en la onda III es significativa para las intensidades de 70, 80 y 90dB. En el grupo de animales tratados con GMS solo existen diferencias significativas entre los machos y hembras de 6 meses para la amplitud de las ondas II y III.

Estudio del efecto del factor sexo

PEATC onda I (Ganglio Coclear)

EFFECTO DEL FACTOR SEXO POR GRUPO DE EDAD Y TRATAMIENTO

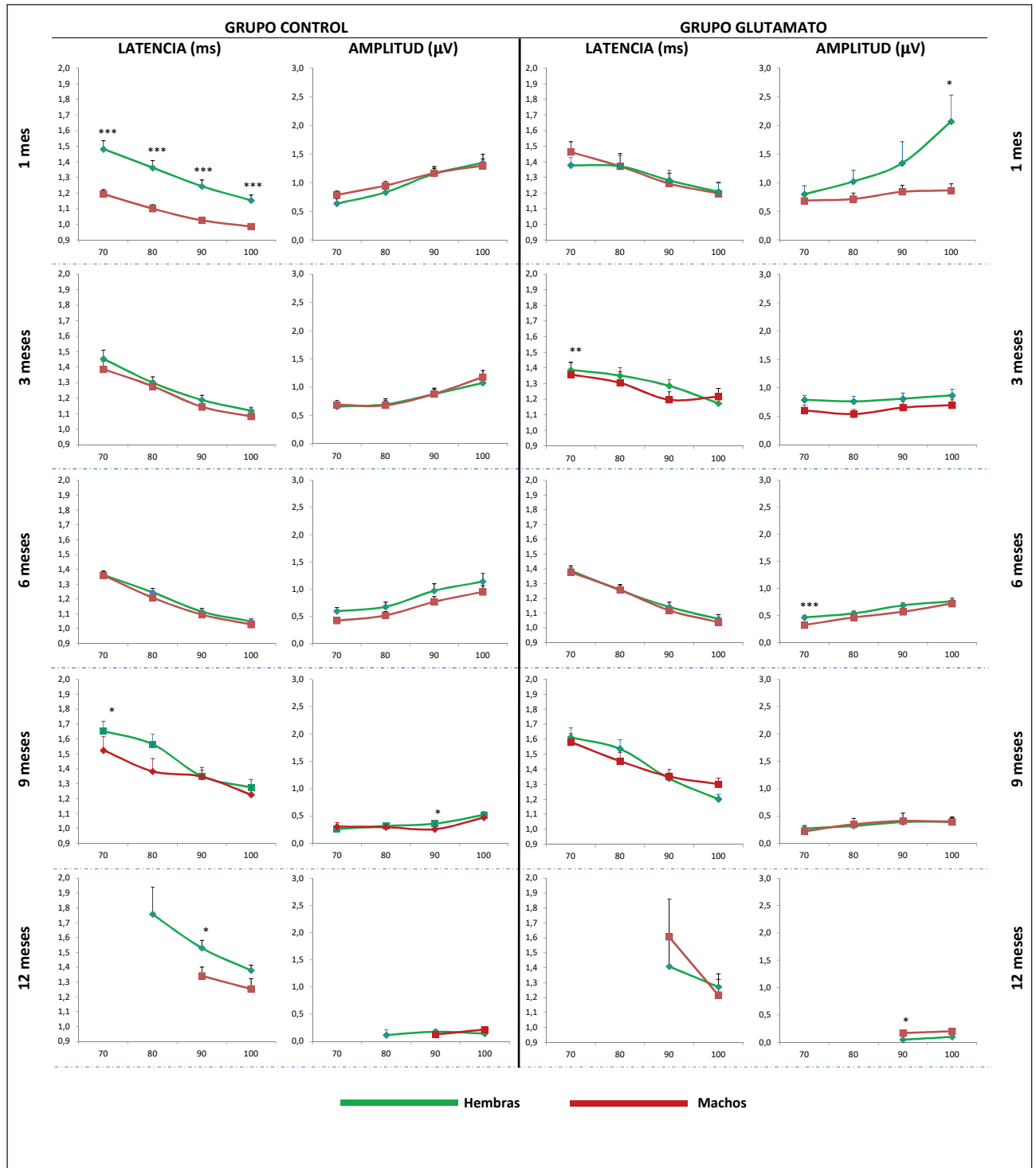


Figura 17: Efecto del sexo: Onda I. Representa la actividad ganglio espiral coclear. Se exponen los resultados de los efectos debidos al sexo en los animales tratados (derecha), y en el grupo control (izquierda) separados por cada edad. Se representa la latencia (ms) y amplitud (µV) de la onda I del PEATC, para las intensidades de 70, 80, 90 y 100dB(SPL) en los machos y hembras de los distintos grupos experimentales. P-Valor > 0.05 = NS; * = 0,05 > P-Valor > 0.01; ** = 0.01 > P-Valor > 0.001; *** = 0.001 > p-Valor.

Estudio del efecto del factor sexo

PEATC onda II (Núcleo Coclear)

EFFECTO DEL FACTOR SEXO POR GRUPO DE EDAD Y TRATAMIENTO

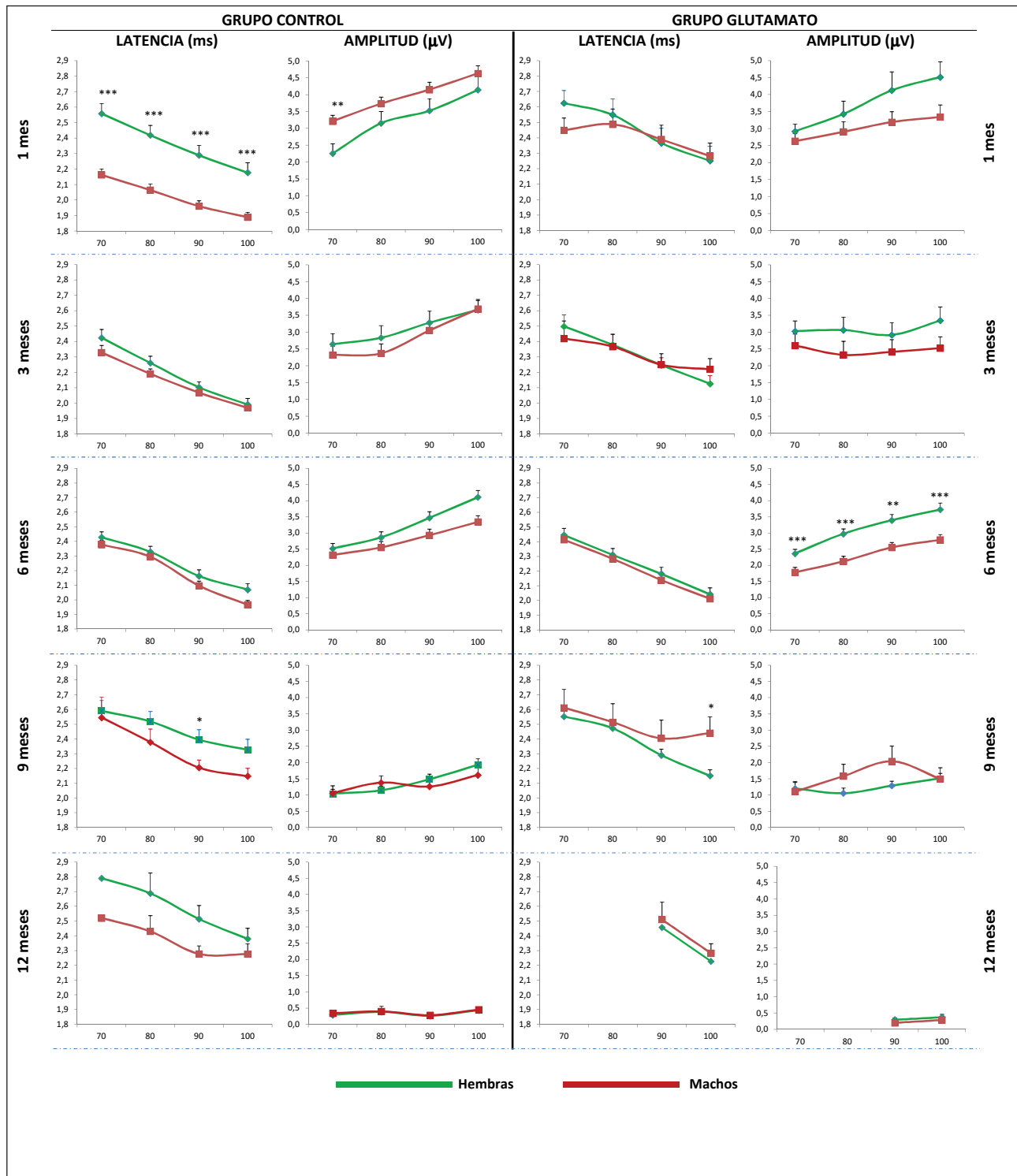


Figura 18: Efecto del sexo: Onda II. Representa la actividad núcleo coclear. Se exponen los resultados de los efectos debidos al sexo en los animales tratados (derecha), y en el grupo control (izquierda) separados por cada edad. Se representa la latencia (ms) y amplitud (µV) de la onda II del PEATC, para las intensidades de 70, 80, 90 y 100dB(SPL) en los machos y hembras de los distintos grupos experimentales. P-Valor > 0.05 = NS; * = 0,05 > P-Valor > 0.01; ** = 0.01 > P-Valor > 0.001; *** = 0.001 > p-Valor.

Estudio del efecto del factor sexo

PEATC onda III (Complejo Olivar Superior)

EFFECTO DEL FACTOR SEXO POR GRUPO DE EDAD Y TRATAMIENTO

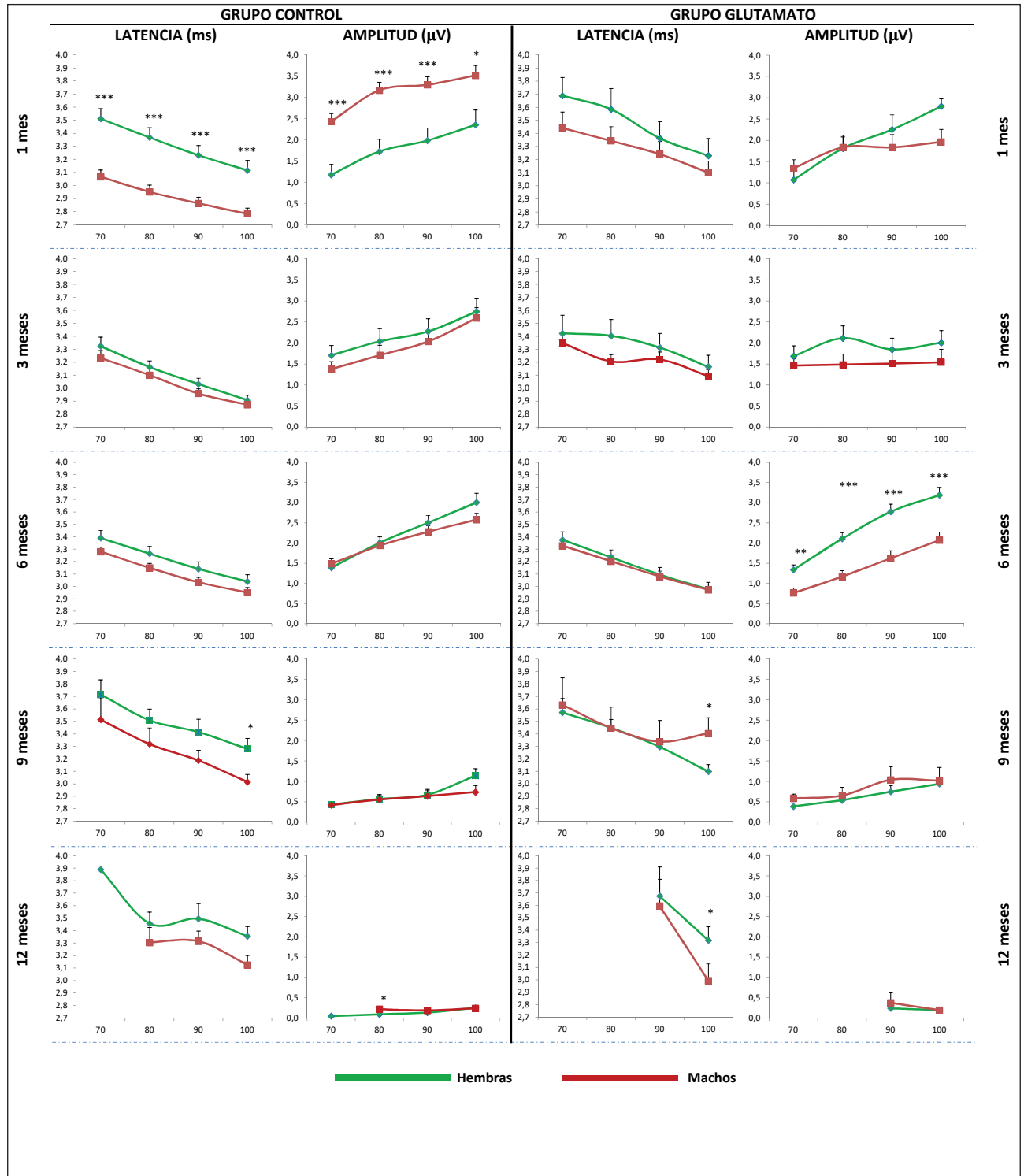


Figura 19: Efecto del sexo: Onda III. Representa la actividad complejo olivar superior. Se exponen los resultados de los efectos debidos al sexo en los animales tratados (derecha), y en el grupo control (izquierda) separados por cada edad. Se representa la latencia (ms) y amplitud μV de la onda III del PEATC, para las intensidades de 70, 80, 90 y 100dB(SPL) en los machos y hembras de los distintos grupos experimentales. P-Valor > 0.05 = NS; * = $0.05 > \text{P-Valor} > 0.01$; ** = $0.01 > \text{P-Valor} > 0.001$; *** = $0.001 > \text{p-Valor}$.

4.1.3. Estudio del efecto del tratamiento

El tratamiento con GMS generó efectos dispares en ambos sexos. En general, provocó cambios de la latencia y de la amplitud de cada una de las ondas del PEATC, pero esos cambios fueron más evidentes y estadísticamente significativos en los machos que en las hembras.

De hecho, en el caso de las hembras, el tratamiento con GMS no produce cambios estadísticamente significativos, ni en la latencia ni en la amplitud, de ninguna de las ondas estudiadas, comparando los registros de las hembras controles y las que han recibido el tratamiento. Por el contrario, en el caso del grupo de machos, hay diferencias significativas entre los registros control y tras el tratamiento. Así, presentan diferencias de latencia debidas al tratamiento con GMS estadísticamente significativas para los grupos de 1, 3 y 9 meses de edad en las ondas II y III. La amplitud para estos grupos de edad también presenta diferencias significativas entre los grupos control y tratados, en la onda I, II y III a 100dB en los grupos de 1 y 3 meses y en 1 y 9 meses para todas las intensidades analizadas. A los 6 meses, existen diferencias significativas también para la amplitud, del grupo de los machos tratados a todas las intensidades estudiadas.

Estudio del efecto del factor tratamiento

PEATC onda I (Ganglio Espiral Coclear)

EFFECTO DEL FACTOR TRATAMIENTO POR GRUPO DE EDAD Y SEXO

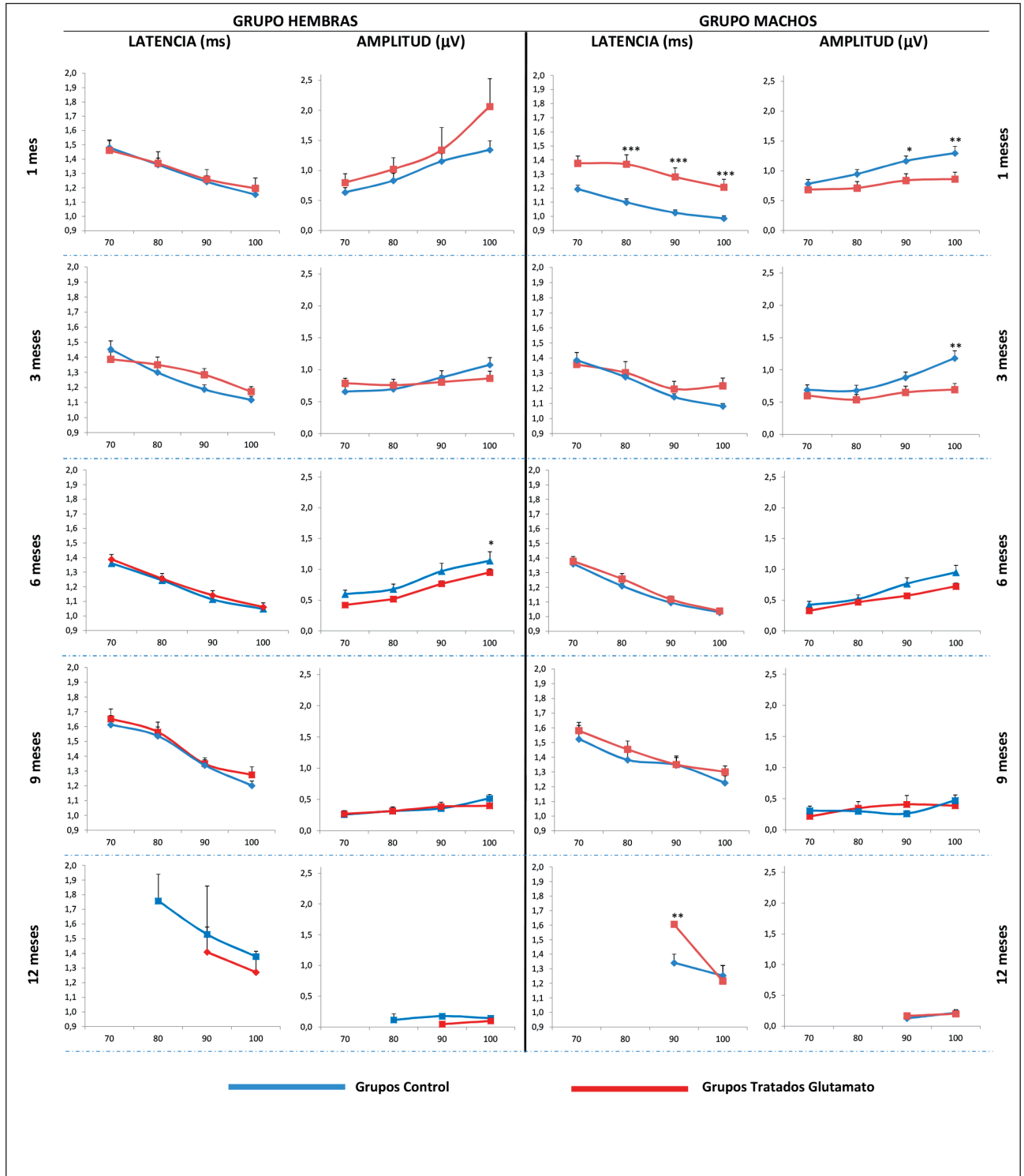


Figura 20: Efecto del tratamiento: Onda I. Representa la actividad ganglio espiral coclear. Se exponen los resultados de los efectos producidos por el tratamiento con GMS en los grupos de hembras (izquierda) y de machos (derecha), en función de la edad. Se representa la latencia (ms) y amplitud (µV) de la onda I, para las intensidades de 70, 80, 90 y 100dB(SPL) en los distintos grupos experimentales. P-Valor > 0.05 = NS; * = 0,05 > P-Valor > 0.01; ** = 0.01 > P-Valor > 0.001; *** = 0.001 > p-Valor.

Estudio del efecto del factor tratamiento

PEATC onda II (Núcleo Coclear)

EFFECTO DEL FACTOR TRATAMIENTO POR GRUPO DE EDAD Y SEXO

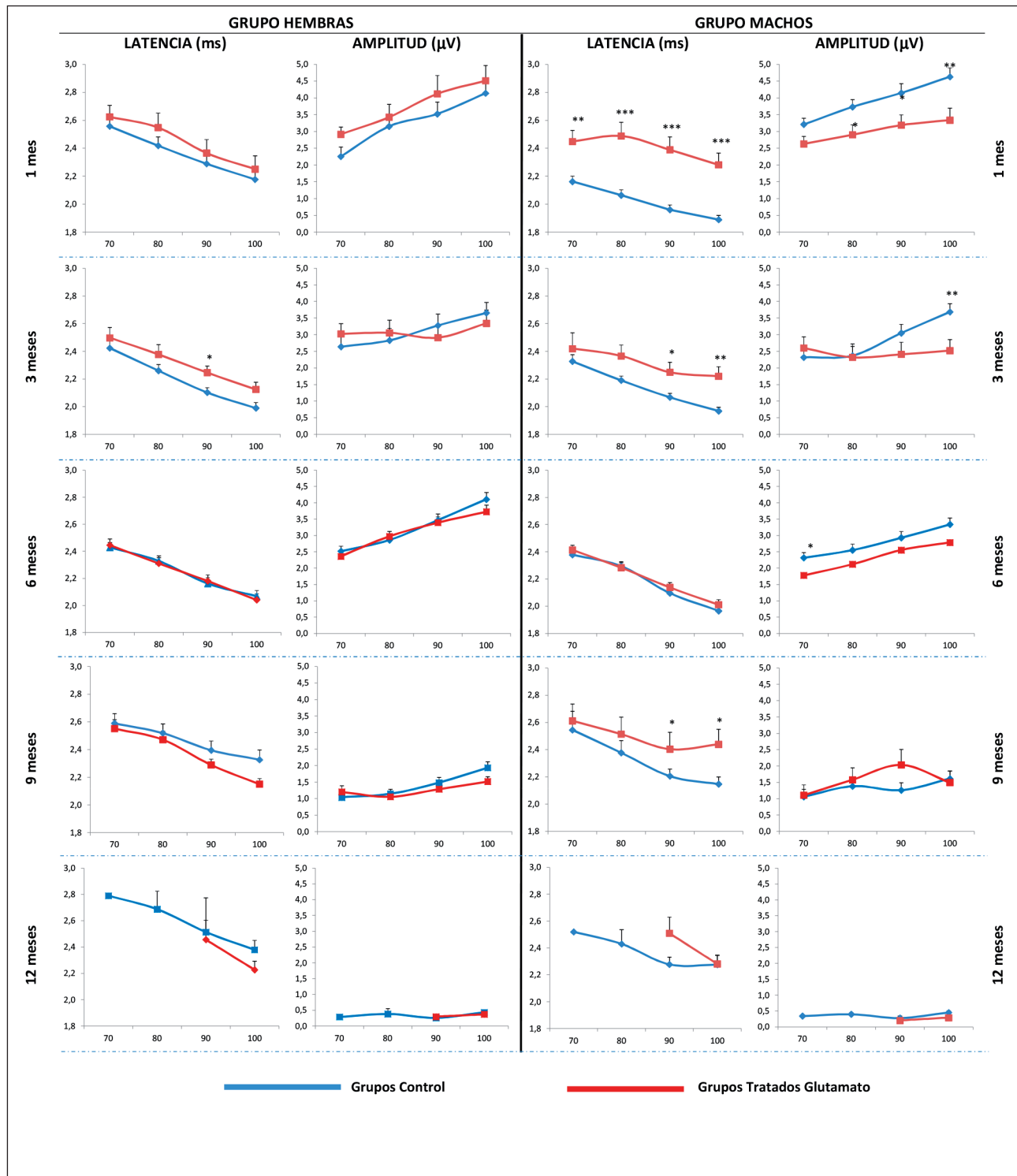


Figura 21: Efecto del tratamiento: Onda II. Representa la actividad núcleo coclear. Se exponen los resultados de los efectos producidos por el tratamiento con GMS en los grupos de hembras (izquierda) y de machos (derecha), en función de la edad. Se representa la latencia (ms) y amplitud (µV) de la onda II, para las intensidades de 70, 80, 90 y 100dB(SPL) en los distintos grupos experimentales. P-Valor > 0.05 = NS; * = 0,05> P-Valor >0.01; ** = 0.01 > P-Valor > 0.001; *** = 0.001 > p-Valor.

Estudio del efecto del factor tratamiento

PEATC onda III (Complejo Olivar Superior)

EFFECTO DEL FACTOR TRATAMIENTO POR GRUPO DE EDAD Y SEXO

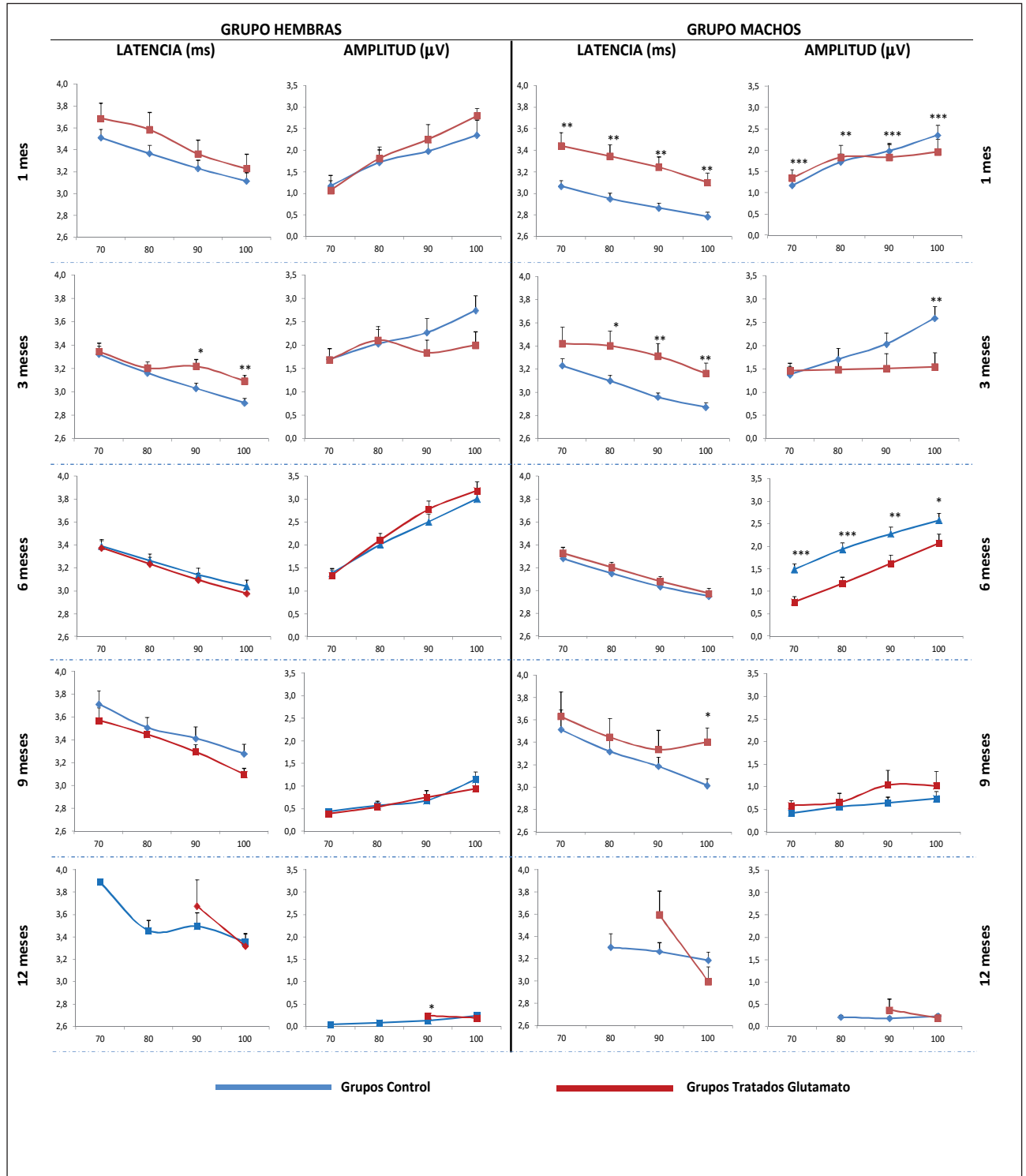


Figura 22: Efecto del tratamiento: Onda III. Representa la actividad complejo olivar superior. Se exponen los resultados de los efectos producidos por el tratamiento con GMS en los grupos de hembras (izquierda) y de machos (derecha), en función de la edad. Se representa la latencia (ms) y amplitud (µV) de la onda III, para las intensidades de 70, 80, 90 y 100dB(SPL) en los distintos grupos experimentales. P-Valor > 0.05 = NS; * = 0,05> P-Valor >0.01; ** = 0.01 > P-Valor > 0.001; *** = 0.001> p-Valor.

4.1.4. Estudio de los umbrales auditivos del PEATC

Con objeto de obtener una prueba para determinar el nivel auditivo de cada animal, la prueba de PEATC se le realizó a cada animal hasta determinar el umbral auditivo. El umbral auditivo en esta prueba se obtiene conociendo la última intensidad a la que aparece la onda de referencia. En el ratón la onda de referencia para los PEATC es la onda II, al ser esta la última que desaparece con la disminución de la intensidad. Para determinar el umbral se realizó la prueba de PEATC en pasos de disminución de 10dB desde 100 hasta los 30 dB de intensidad.

El análisis estadístico del umbral auditivo es muy significativo ($p\text{-valor} \leq 0,001$) para la onda II en todos los grupos de edad y tratamiento. También entre los grupos de sexo, sobretodo a los 3 ya los 9 meses.

Los animales jóvenes, de 1 mes, presentan diferencias significativas entre los grupos de machos y hembras, tanto en los animales control, como en los tratados. Se mantienen las diferencias significativas entre machos y hembras, pero solo en los animales a los que se les ha administrado el tratamiento de GMS. En los controles no hay diferencias significativas.

El grupo de animales de 6 meses es el que presenta menos significación al valorar los efectos del sexo y tratamiento, mientras que a los 9 meses, vuelven a existir diferencias significativas, al igual que a en los animales jóvenes, hay diferencias significativas entre los grupos de hembras y machos, con y sin la administración de GMS.

Cuando los animales son más mayores, a los 12 meses, las diferencias entre hembras y machos controles son muy significativas, respecto a los demás grupos de edad.

ESTUDIO DEL UMBRAL AUDITIVO

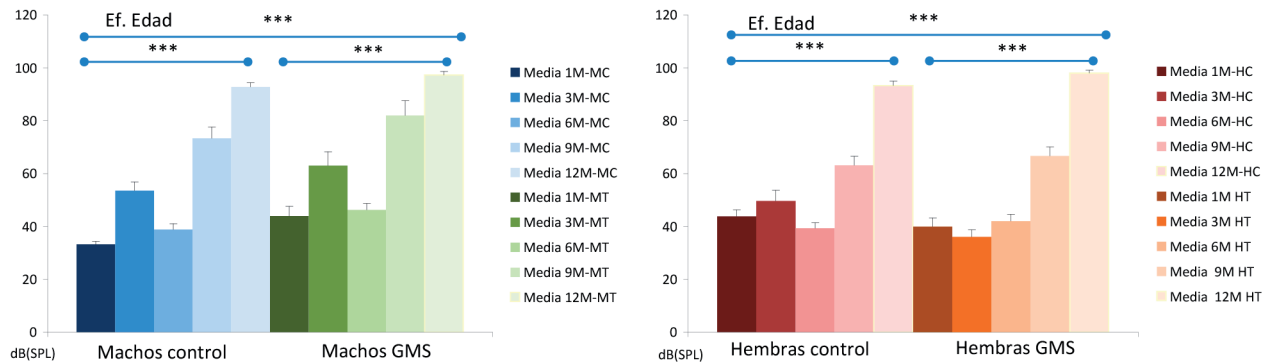


Figura 23a: Umbral auditivo del PEATC. Histograma representa el umbral de la onda II del registro de PEATC a 90dB(SPL) en todas las edades. Izquierda machos, divididos en grupo control (azul) y tratados con GMS (verde) y derecha, hembras divididas en grupo control (rojo) y tratadas con GMS (naranja). P-Valor > 0.05 = NS; * = 0,05 > P-Valor > 0.01; ** = 0.01 > P-Valor > 0.001; *** = 0.001 > p-Valor.

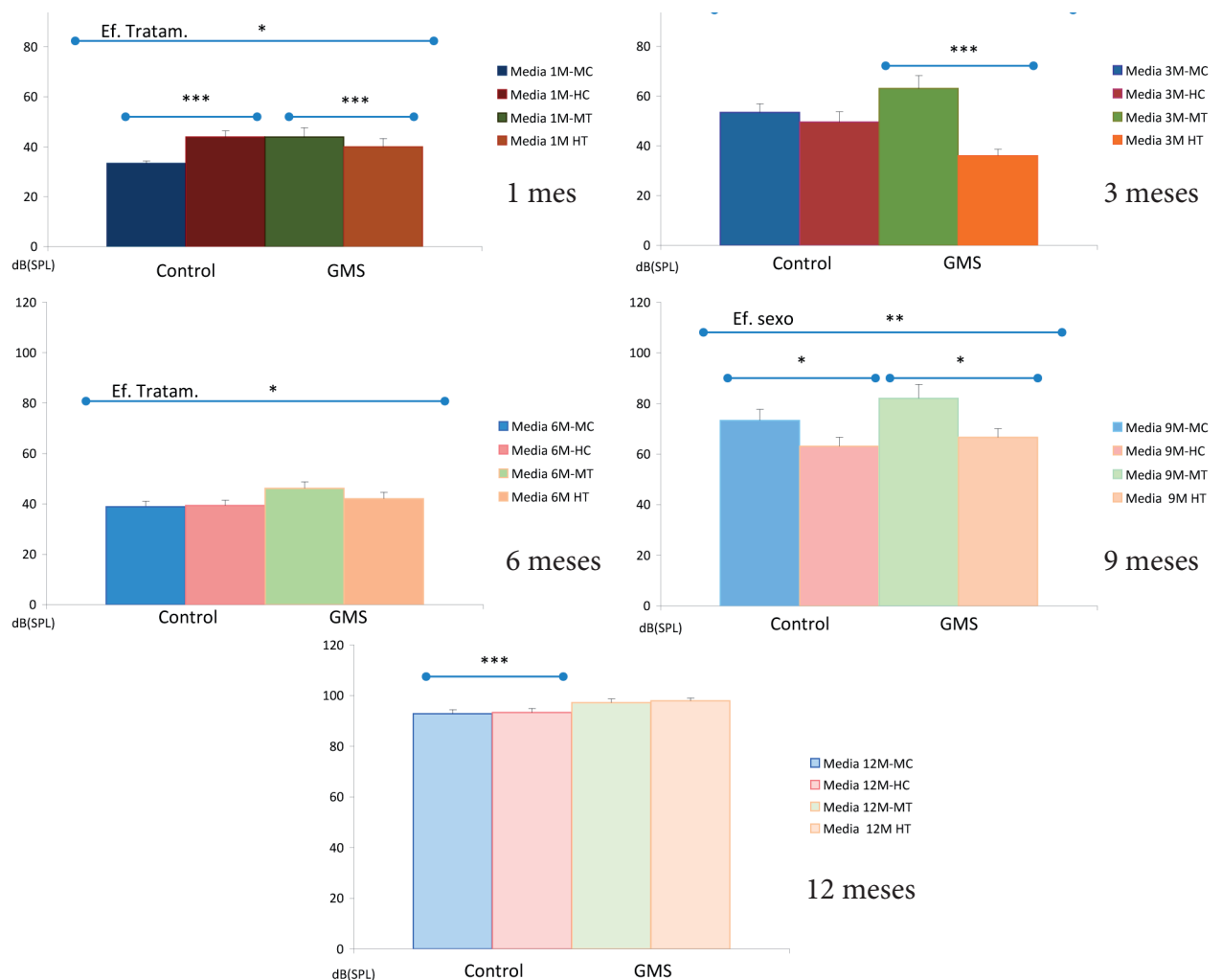


Figura 23b: Umbral auditivo del PEATC por edades. Cada histograma representa una edad. Azul: Machos control. Verde: Machos tratados. Rojo: Hembras control. Naranja: Hembras tratadas. P-Valor > 0.05 = NS; * = 0,05 > P-Valor > 0.01; ** = 0.01 > P-Valor > 0.001; *** = 0.001 > p-Valor.

4.1.5. Estudio de evolución del PEATC durante la edad

Para este estudio se han tomado únicamente los valores de latencia (ms) y amplitud (μ V) de los registros de PEATC de todos los grupos de edad, tratamiento y de ambos sexos, a la intensidad de 90 dB(SPL), realizándose gráficas para observar la evolución de los efectos del sexo y el tratamiento a lo largo del envejecimiento de los distintos grupos de estudio.

Se presentan por una parte, las gráficas de evolución de ambos sexos en los grupos control y en función de la administración de GMS y por otra parte, gráficas para valorar los efectos debidos al tratamiento, en ambos sexos. De esta forma podrán valorarse los efectos producidos por cada parámetro a lo largo de la edad, obteniendo una información añadida a este estudio, relativa a las variaciones intersexuales entre hembras y machos y la edad a la que se podrían estar produciendo.

a) Estudio de la evolución del efecto del sexo en la edad

La latencia de las ondas en las hembras del grupo control de 1 mes es muy alta, similar a las hembras de 9 meses, pero presentan su mejor latencia a los 6 meses para la onda I y a los 3 meses para las ondas II y III. Por otro lado, en los machos la latencia de las tres ondas es similar y va aumentando en función de la edad.

En los grupos de animales tratados, se observa un aumento muy evidente de la latencia en la onda III tanto en hembras como en machos. Los machos tratados de 3 meses son los que tienen mejores valores de latencia, mientras que en las hembras tratadas esta disminución de la latencia se produce en los 6 meses.

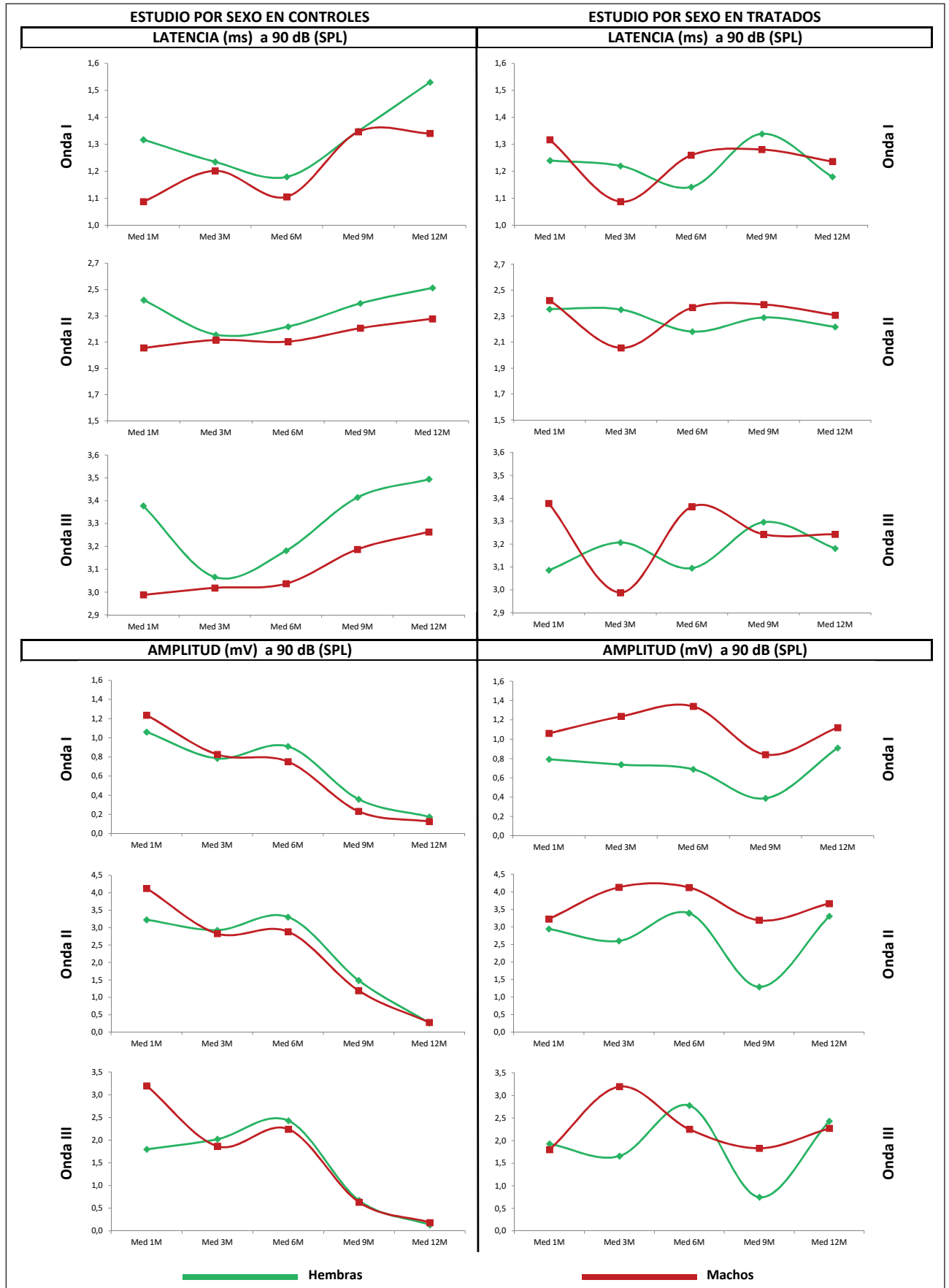
Las amplitudes de los animales controles son muy similares en hembras y machos, pero las hembras control de 1 mes tienen una amplitud mucho mayor que los machos de su misma edad. En ambos grupos, se produce una disminución de la amplitud con la edad, hasta que a los 12 meses los animales casi están en 0 μ V en las tres ondas estudiadas, mientras que a los 6 meses la amplitud es mayor que a los 3 meses en hembras y machos.

Figura 24: Evolución de los efectos del tratamiento durante la edad: Se representan los efectos producidos por el tratamiento (derecha) respecto a los grupos controles (izquierda) de hembras y machos respecto a la edad. Se presenta la evolución que siguen a lo largo de la edad, en cuanto a latencia (ms) y amplitud (μ V) de las ondas I, II y III, a 90dB(SPL) de intensidad en los distintos grupos de animales.

Estudio de la evolución del Sexo en la edad

PEATC onda I, II y III

Figura 24



La amplitud en el caso de los animales tratados sigue una tendencia similar a lo largo de la edad en hembras y machos en las ondas I y II, siendo la mayor amplitud a 6 meses y la menor la de los ratones de 9 meses. En la onda III ambos grupos de animales tratados, aparentemente se comportan de distinta forma, ya que los machos tienen su amplitud máxima a los 3 meses, mientras que en las hembras tratadas, este hecho se da a los 6 meses. La mínima amplitud en ambos grupos es a los 9 meses, pero es mucho más exacerbada en el caso de las hembras tratadas.

b) Estudio de la evolución del Tratamiento en la edad

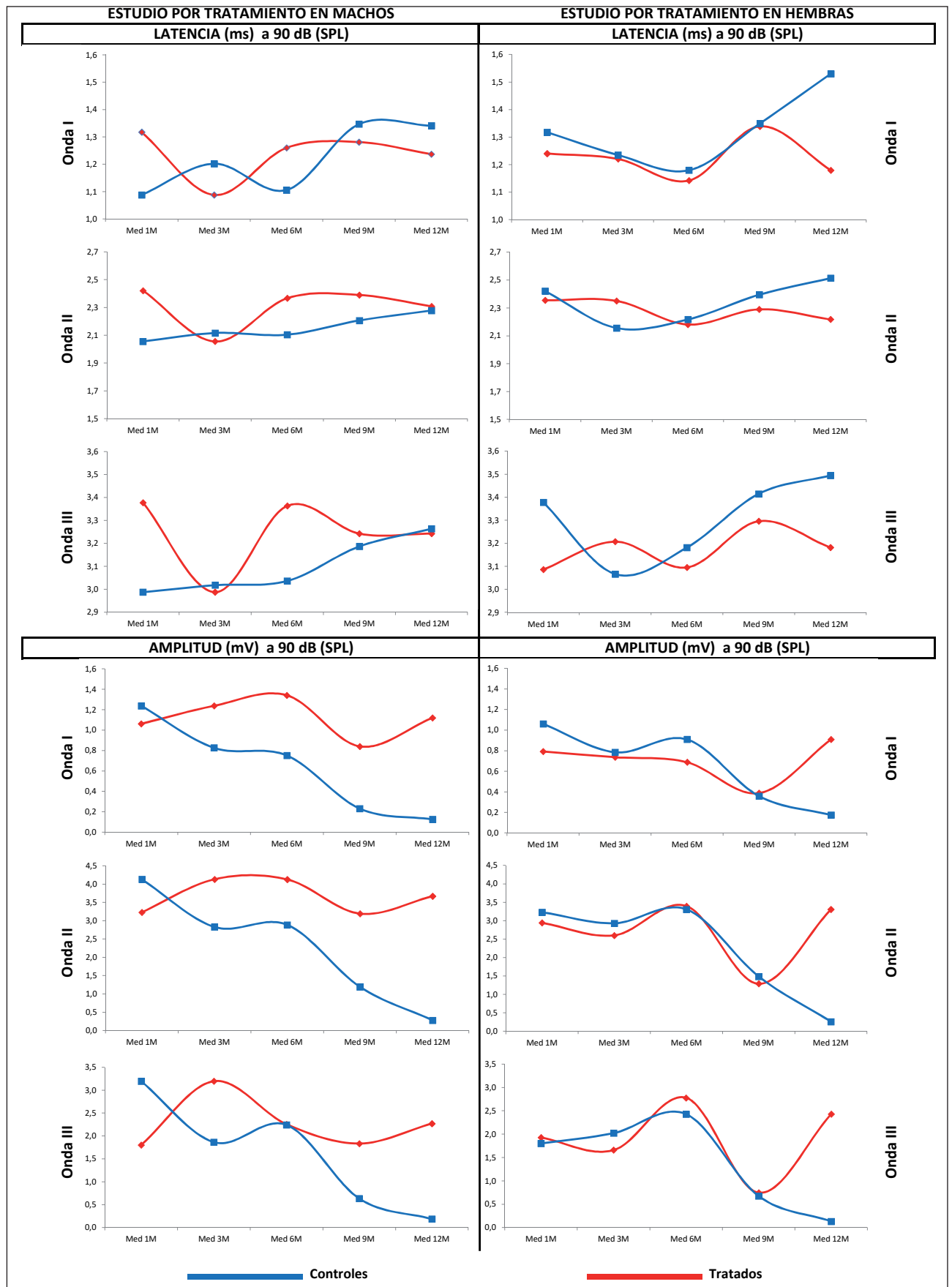
La latencia en las hembras controles respecto de las tratadas en el caso de la onda I es similar, mientras que en las ondas II y III parece afectarles el tratamiento, aumentando la latencia de la onda I y II a los 3 meses, mientras que a los 6 meses se mantiene igual y a los 9 y 12 meses disminuye considerablemente. Los machos tratados presentan este efecto de disminución de la latencia respecto a los valores control solo a los 3 meses, mientras que se ven más afectados con el avance de la edad. En la amplitud de las hembras no se observan cambios con el tratamiento, salvo a los 12 meses en los que las hembras tratadas aumentan mucho su amplitud en las tres ondas estudiadas. Sin embargo, los machos tratados aumentan de manera general su amplitud en todas las edades, salvo los individuos de un mes, en los que disminuye con el tratamiento de GMS.

Figura 25: Evolución de los efectos del tratamiento durante la edad. Se representan los efectos debidos al sexo, en machos (derecha) respecto a las hembras (izquierda) de los animales controles y tratados respecto a la edad. Se presenta la evolución que siguen a lo largo de la edad, en cuanto a latencia (ms) y amplitud (μ V) de las ondas I, II y III, a 90 dB(SPL) de intensidad en los distintos grupos de animales.

Estudio de la evolución del Tratamiento en la edad

PEATC onda I, II y III

Figura 25



4.1.6. Estudio electrofisiológico en función del ciclo estral

a) Resultados del efecto de la edad

Tal y como se ha comentado en el apartado de material y métodos, para este apartado experimental, se han utilizado los animales pertenecientes a los dos grupos de edades centrales del experimento principal. Así, se ha evaluado el efecto de la edad en los grupos de 6 y de 9 meses y, dentro de cada uno de ellos, cada grupo de ciclo estral de hembras y el grupo de machos.

- Onda I del PEATC:

Para la onda I del PEATC, la referente para conocer el estado de la activación del ganglio espiral coclear, las hembras del grupo control en fase de P-E muestran diferencias significativas, pero únicamente en las medidas de amplitud, entre los animales de 6 y de 9 meses, ya que en la latencia de la onda I no hay diferencias significativas entre los dos grupos de edad.

En cuanto a las hembras en fase de M-D no presentan diferencias significativas entre los dos grupos de edad del grupo control, pero también se observa en la gráfica que la latencia de las hembras de 6 meses es muy inferior a la de las de 9 meses, mientras que las amplitudes son similares en las dos edades.

En el caso de los machos, tanto en la latencia como en la amplitud existen diferencias muy significativas para todas las intensidades entre los dos grupos de edad en estos animales sin el tratamiento con GMS.

En el grupo de hembras tratadas con GMS, para la Onda I del PEATC, existen diferencias significativas entre los dos grupos de edad. En el caso de las hembras en fase de P-E durante el tratamiento, se observan estas diferencias significativas tanto en la latencia como en la amplitud de esta onda. Sin embargo, en la gráfica, se observan diferencias también entre los dos grupos de edad en las hembras en fase de D-M, aunque con mayor dispersión de los datos.

En cuanto a los machos, se observan diferencias muy significativas en los dos grupos de edad, tras el tratamiento con GMS, en la latencia de la onda, mientras que no presentan diferencias significativas en la amplitud.

Estudio del efecto del factor edad

PEATC onda I (Ganglio Espiral Coclear)

EFFECTO DEL FACTOR EDAD POR GRUPO DE SEXO Y TRATAMIENTO

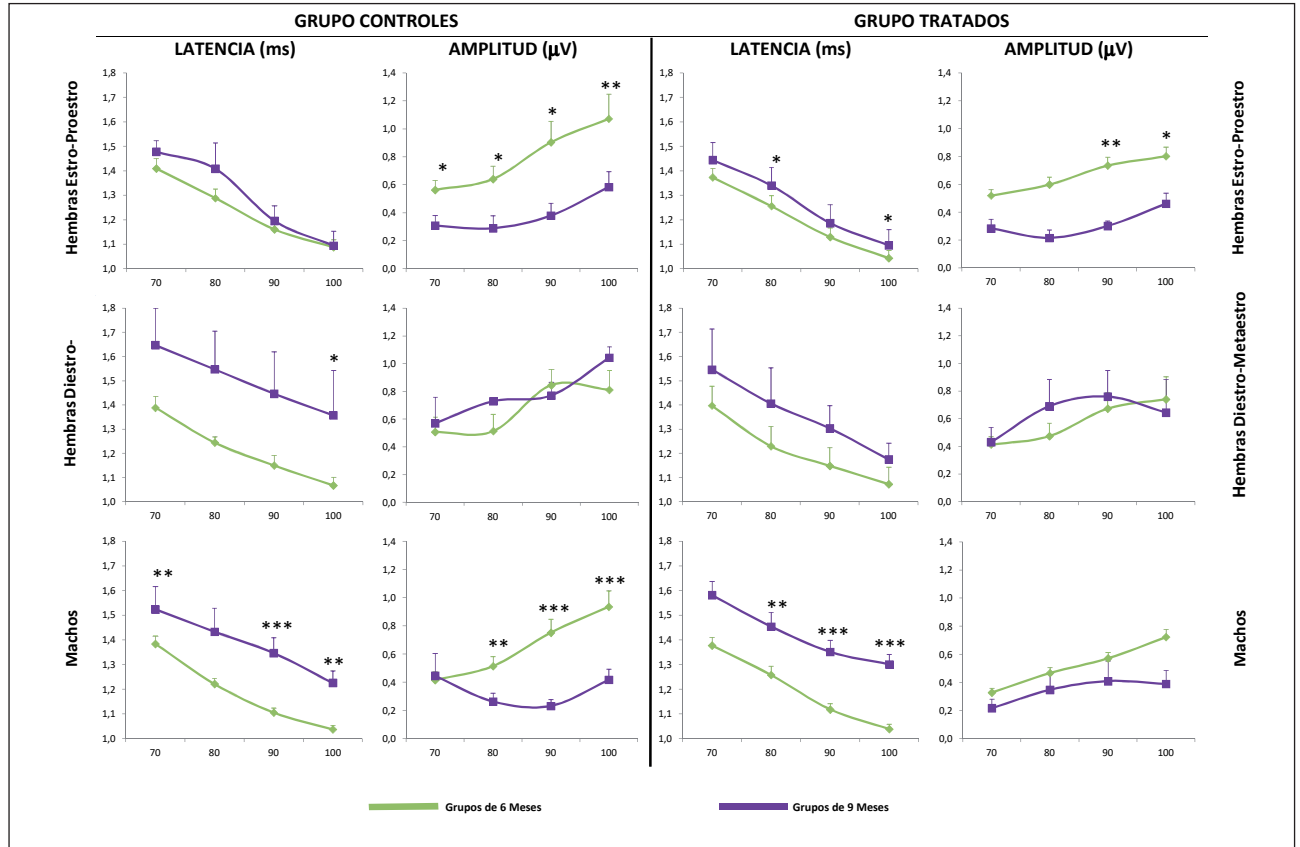


Figura 26: Efecto del tratamiento en función de la edad : En esta gráfica se representan los efectos producidos por el tratamiento en los dos grupos controles (izquierda) respecto a los tratados (derecha) de machos y hembras respecto a los dos grupos de ciclo estral (grupo de proestro-estro y grupo de metaestro-diestro) en los animales de 6 y 9 meses. Queda reflejado el efecto producido por el tratamiento con GMS en la edad, en cuanto a latencia (ms) y amplitud (µV) de la onda I para las intensidades de 70, 80, 90 y 100dB en los distintos grupos de animales. P-Valor > 0.05 = NS; * = 0.05 > P-Valor > 0.01; ** = 0.01 > P-Valor > 0.001; *** = 0.001 > p-Valor.

- Onda II del PEATC:

Para la Onda II del PEATC, que proviene de la activación neuronal del núcleo coclear, existen diferencias muy significativas en la amplitud de todos los grupos de edad. Las hembras en fase de P-E, tanto en el grupo control como en el de tratamiento con GMS no presentan resultados similares entre los dos grupos de edad.

Pero, Las hembras en fase de M-D si muestran diferencias significativas en la amplitud tanto en animales control como en los tratados entre los grupos de 6 y de 9 meses. La latencia de la onda II en este grupo experimental no presenta diferencias significativas entre los grupos de edad, pero en la gráfica, la latencia de la onda II muestra una tendencia a ser diferente en cada grupo de edad, siendo mucho menor la latencia de la onda II en el caso de los animales de 6 meses.

En cuanto a los machos, hay diferencias muy significativas en la amplitud registrada en los grupos de 6 y 9 meses, siendo mucho más alta la amplitud de la onda II a los 6 meses de edad. En los machos de ambas edades, el tratamiento con GMS, produce un aumento de la latencia y una disminución de la amplitud de la onda II, aunque parece verse más afectada la amplitud de esta onda a los 6 meses.

Estudio del efecto del factor edad

PEATC onda II (Núcleo Coclear)

EFFECTO DEL FACTOR EDAD POR GRUPO DE SEXO Y TRATAMIENTO

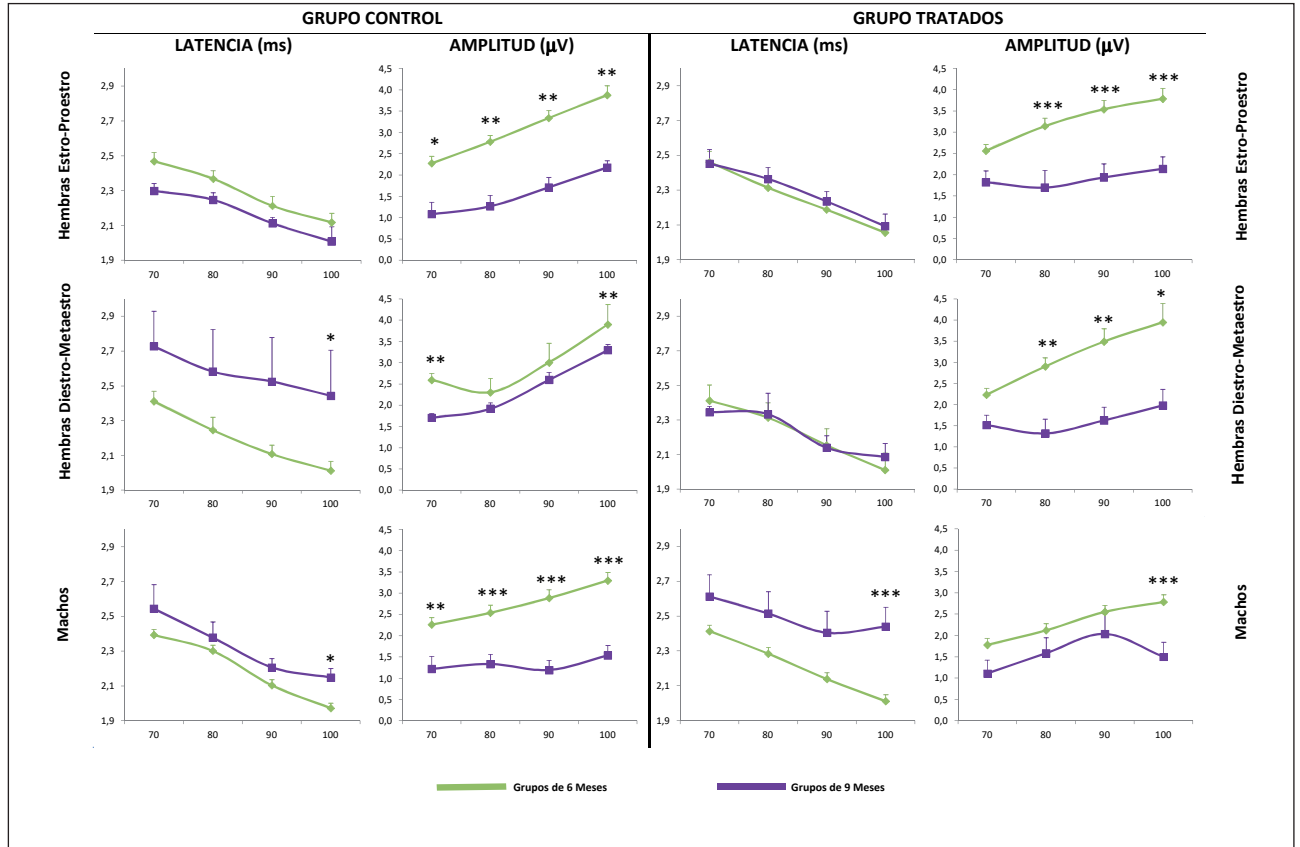


Figura 27: Efecto del tratamiento en función de la edad : En esta gráfica se representan los efectos producidos por el tratamiento en los dos grupos controles (izquierda) respecto a los tratados (derecha) de machos y hembras respecto a los dos grupos de ciclo estral (grupo de proestro-estro y grupo de metaestro-diestro) en los animales de 6 y 9 meses. Queda reflejado el efecto producido por el tratamiento con GMS en la edad, en cuanto a latencia (ms) y amplitud (µV) de la onda II para las intensidades de 70, 80, 90 y 100dB en los distintos grupos de animales. P-Valor > 0.05 = NS; * = 0,05 > P-Valor > 0.01; ** = 0.01 > P-Valor > 0.001; *** = 0.001 > p-Valor.

- Onda III del PEATC:

La onda III del PEATC, que se corresponde con la activación que se produce en el complejo olivar superior tras la estimulación auditiva, presenta diferencias muy significativas entre todos los grupos de edad evaluados.

En el grupo de hembras en fase de P-E, el patrón es similar a las de la onda II, mostrando diferencias muy significativas en la amplitud a todas las intensidades de estimulación y tanto en el grupo control como en el tratado con GMS, mientras que la latencia de la onda no presenta diferencias ni estadísticas ni observables en las gráficas entre los dos grupos de edad. Sin embargo, y tal y como sucede en el caso de la onda II, las hembras en fase de M-D tienen diferencias muy significativas también en la amplitud, siendo esta diferencia mucho mayor en el caso de los animales tratados con GMS donde el tratamiento produce un aumento de amplitud muy significativo. Además, en las hembras de 9 meses parece haber también una disminución de la latencia con el tratamiento de GMS, igualando su latencia a la de animales más jóvenes.

En el grupo de machos, se observa el mismo efecto que en la onda II. Existen diferencias muy significativas entre los animales de los distintos grupos de edad, pero sobretodo en la amplitud de los animales controles. Con el tratamiento, disminuye más la amplitud registrada en los animales de 6 meses, y ambos grupos aumentan sus latencias de la onda III.

Estudio del efecto del factor edad

PEATC onda III (Complejo Olivar Superior)

EFFECTO DEL FACTOR EDAD POR GRUPO DE SEXO Y TRATAMIENTO

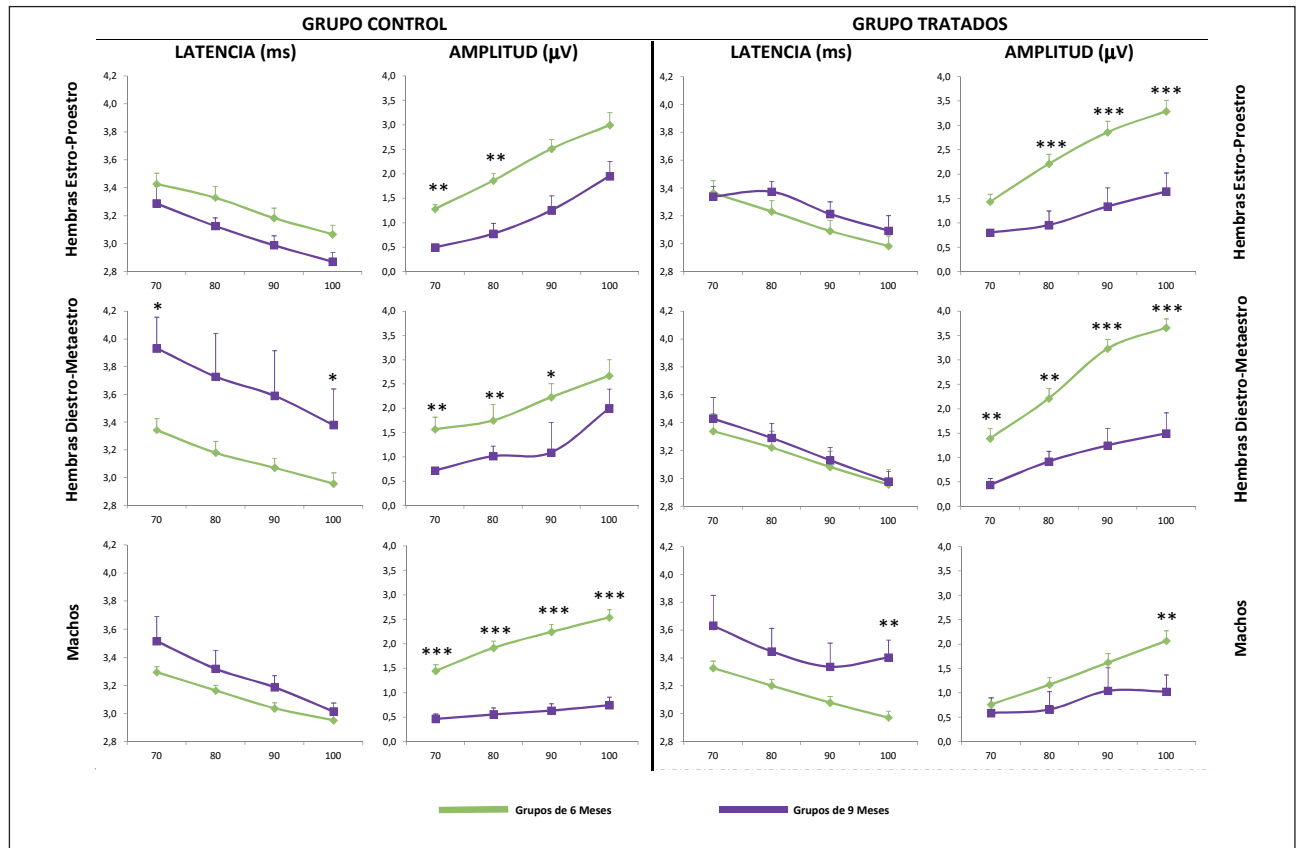


Figura 28: Efecto del tratamiento en función de la edad : En esta gráfica se representan los efectos producidos por el tratamiento en los dos grupos controles (izquierda) respecto a los tratados (derecha) de machos y hembras respecto a los dos grupos de ciclo estral (grupo de proestro-estro y grupo de metaestro-diestro) en los animales de 6 y 9 meses. Queda reflejado el efecto producido por el tratamiento con GMS en la edad, en cuanto a latencia (ms) y amplitud (µV) de la onda III para las intensidades de 70, 80, 90 y 100dB en los distintos grupos de animales. P-Valor > 0.05 = NS; * = 0,05 > P-Valor > 0.01; ** = 0.01 > P-Valor > 0.001; *** = 0.001 > p-Valor.

b) Resultados del efecto del sexo

En este apartado se exponen los registros de PEATC obtenidos de los machos y los dos grupos de hembras, en fase de Diestro-Metaestro y fase Estro-Proestro, comparándose por pares.

- Onda I del PEATC:

Para la onda I, los animales de 6 meses de edad no presentan diferencias significativas entre los grupos de hembras del ciclo estral y el grupo de machos. Pero si se observa una tendencia de las hembras en fase de P-E que han sido tratadas con GMS a aumentar la latencia y la amplitud de esta onda. Las hembras en fase de M-D y los machos se comportan de manera similar, de manera que, mientras que en el grupo control estos animales presentan valores similares a los de las hembras P-E, el los grupos de tratamiento con GMS, presentan valores inferiores de la latencia y de la amplitud de la onda I del PEATC inferiores a los del grupo de hembras P-E. En este sentido, tomando como referencia el registro de latencia de los machos que mantiene valores similares entre el grupo control y el tratado con GMS, se observa que las hembras en fase de M-D presentan menor latencia de esta onda en el grupo de tratamiento con GMS. Por otro lado, en los grupos de 9 meses de edad se observa que en el caso de los controles que las hembras M-D tienen valores mayores que los de los machos y los de las hembras P-E. En el caso de los animales tratados con GMS, Las hembras M-D presentaron, en este caso, valores inferiores a los de los machos de 9 meses, mientras que mostraron, por el contrario, valores de amplitud superiores a los de los machos y las hembras P-E.

- Onda II del PEATC:

En la onda II, los efectos son muy similares a los descritos para la onda I, pero en este caso, existen más diferencias significativas para la amplitud entre el grupo de machos y hembras en fase de P-E, que presentan unos valores de amplitud superiores a los de los

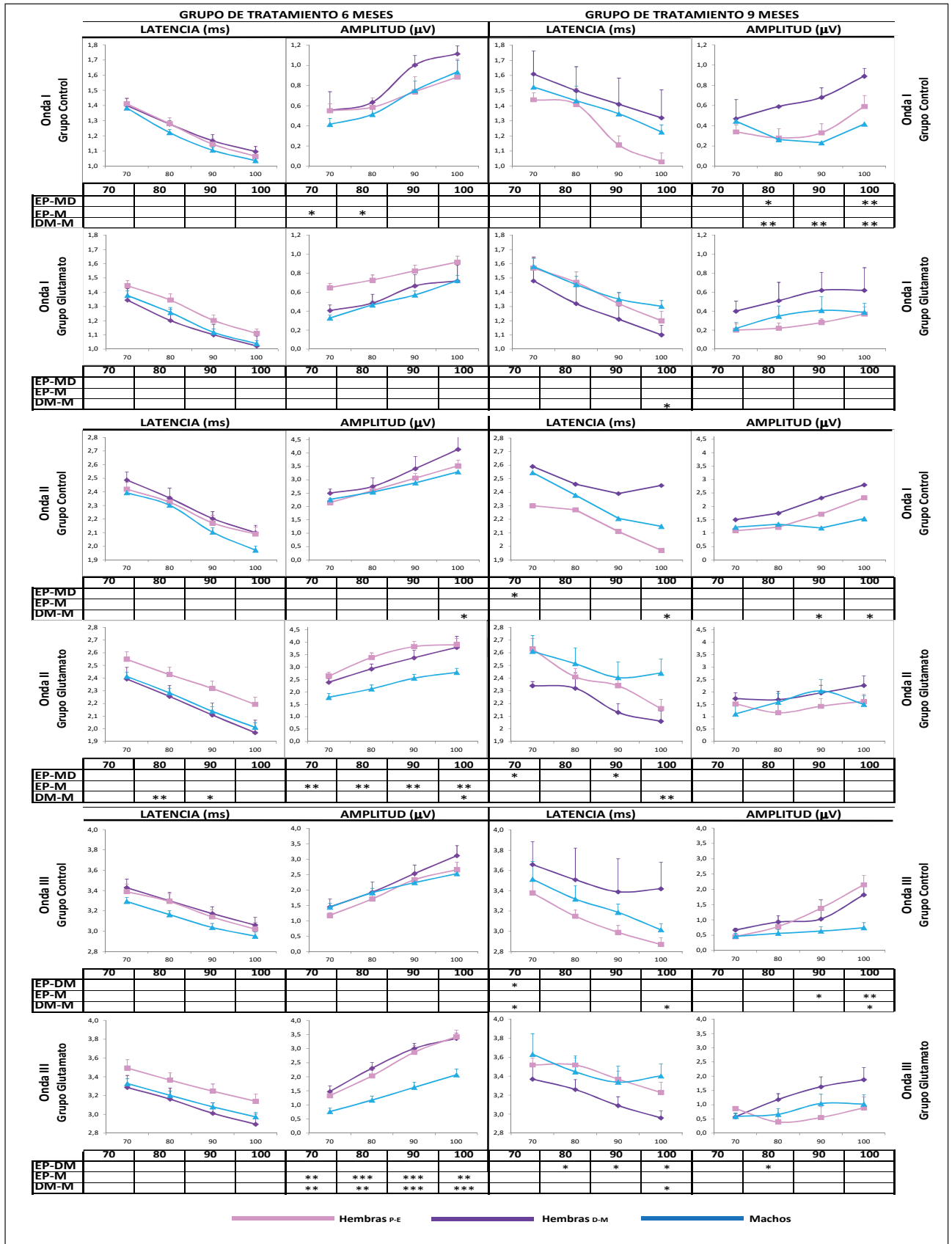
Figura 29: Efecto del tratamiento en función del ciclo estral: En esta gráfica se representan los efectos producidos por el tratamiento en los dos grupos de edad, 6 meses (izquierda) respecto a los 9 meses (derecha) de machos y hembras respecto a los dos grupos de ciclo estral (grupo de proestro-estro y grupo de metaestro-diestro) en las hembras y los machos. Queda reflejado el efecto producido por el tratamiento con GMS, durante el ciclo estral, en cuanto a latencia (ms) y amplitud (mV) de las ondas I, II y III para las intensidades de 70, 80, 90 y 100dB en los distintos grupos de animales. P-Valor > 0.05 = NS; * = 0,05 > P-Valor > 0.01; ** = 0.01 > P-Valor > 0.001; *** = 0.001 > p-Valor.

Estudio del efecto del factor SEXO

PEATC onda I, II y III

EFECTO DEL FACTOR SEXO O FASE DEL CICLO ESTRAL

Figura 29



machos de 6 meses tratados con GMS. Estas hembras P-E también presentan valores de latencia superiores a los demás grupos tratados con GMS tanto de 6 como de 9 meses de edad. Sin embargo, y como en la onda I, las hembras en fase M-D de 9 meses tienen la menor latencia de entre los grupos tratados con GMS mientras que la amplitud se mantiene similar a los de los demás grupos.

- Onda III del PEATC:

Al evaluar el efecto del sexo o el ciclo estral en la onda III, se observan diferencias muy significativas sobre todo al tratar a los animales de 6 meses, y en ambos grupos de hembras, frente al grupo de machos. Mientras que estos aumentan su amplitud y disminuyen su latencia, las hembras de 6 meses parecen aumentar su amplitud con el tratamiento a esta edad. Sin embargo, las hembras de M-D, disminuyen su latencia y en las hembras en fase P-E, el efecto es inverso, aumentando su latencia al igual que los machos o incluso en mayor medida. En los 9 meses, las hembras en esta fase tienen el mismo efecto con el tratamiento, pero las hembras en fase de M-D disminuyen su latencia y aumentan la amplitud con el tratamiento de GMS.

c) Resultados del efecto del tratamiento

Es este apartado se compara el efecto de la administración con GMS a los grupos de 6 y 9 meses de edad, para posteriormente determinar el grado de afectación dependiendo del sexo y en el caso de las hembras, de la fase estral.

- Onda I del PEATC:

Al evaluar estadísticamente el efecto del tratamiento entre los grupos de edad y de sexo, no parece haber diferencias significativas en ninguno para la onda I. El efecto general parece ser un mantenimiento de la latencia en todos los grupos de 6 meses de edad tras el tratamiento, mientras que hay una disminución de la amplitud en los machos y las hembras en fase de M-D. En las hembras en fase de P-E no existen cambios en las gráficas. Parece haber más diferencias en los grupos de 9 meses, en los que para las hembras existe una tendencia a la disminución de la latencia con el tratamiento, sobre todo en las hembras en fase de M-D.

Estudio del efecto del factor tratamiento

PEATC onda I (Ganglio Espiral Coclear)

EFFECTO DEL FACTOR TRATAMIENTO

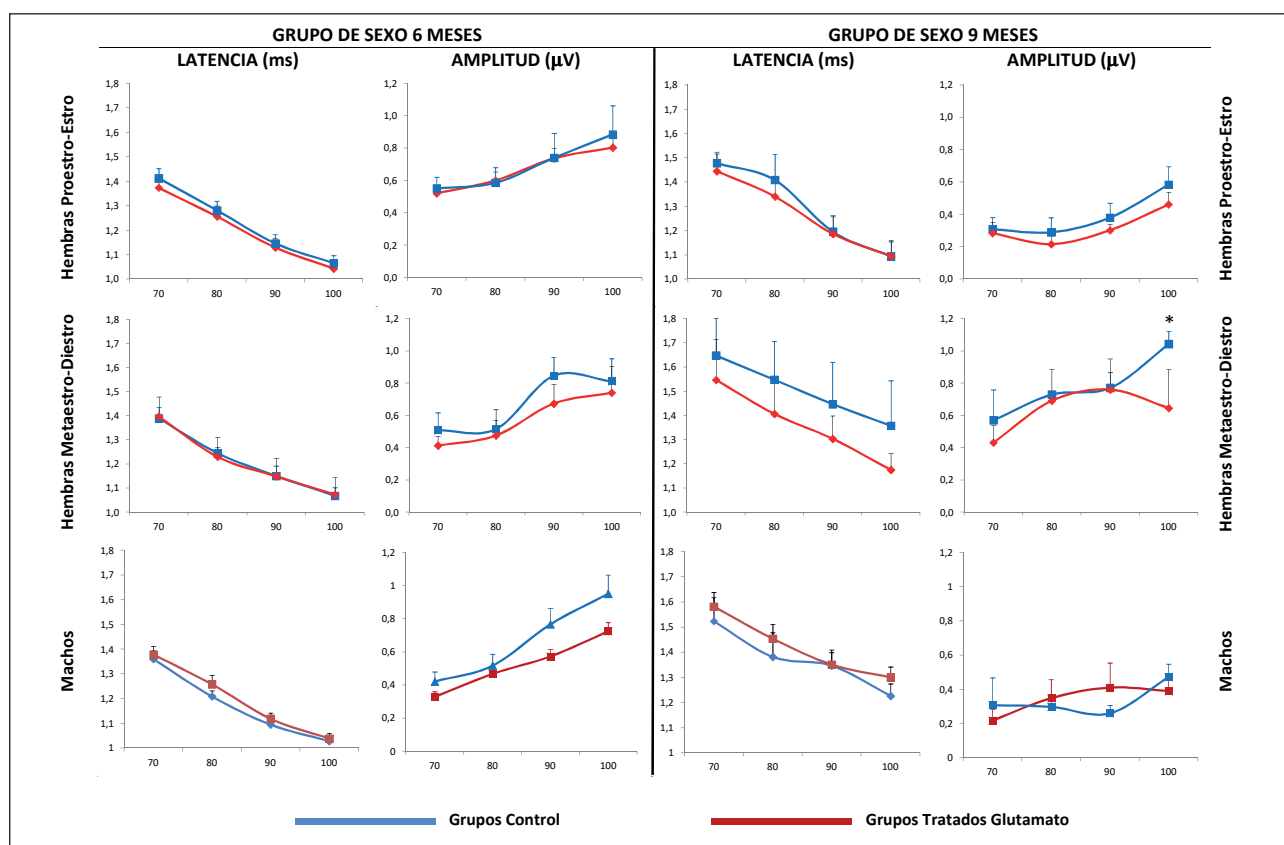


Figura 30: Efecto del tratamiento: En esta gráfica se representan los efectos producidos por el tratamiento en los dos grupos de edad, 6 meses (izquierda) respecto a los 9 meses (derecha) de machos y hembras respecto a los dos grupos de ciclo estral (grupo de proestro-estro y grupo de metaestro-diestro) en las hembras y los machos. Queda reflejado el efecto producido por el tratamiento con GMS, en cuanto a latencia (ms) y amplitud (μV) de la onda I para las intensidades de 70, 80, 90 y 100dB en los distintos grupos de animales. P-Valor > 0.05 = NS; * = 0,05 > P-Valor > 0.01; ** = 0.01 > P-Valor > 0.001; *** = 0.001 > p-Valor.

- Onda II del PEATC:

La onda II tampoco presenta grandes diferencias significativas entre los grupos analizados. Los grupos control presentan el mismo patrón en los tres casos, la latencia no varía con el tratamiento en hembras de las dos fases y machos, pero las amplitudes son más elevadas en las hembras tras el tratamiento que las controles, mientras que en los machos disminuyen con el glutamato. Para los 9 meses de edad, los machos no varían con el tratamiento, mientras que los grupos de las hembras tienen tendencias opuestas entre sí. Las hembras de 9 meses en fase de P-E aumentan su latencia y amplitud con el tratamiento, mientras que las hembras en fase de M-D disminuyen su latencia y amplitud al ser tratadas.

Estudio del efecto del factor tratamiento

PEATC onda II (Núcleo Coclear)

EFFECTO DEL FACTOR TRATAMIENTO

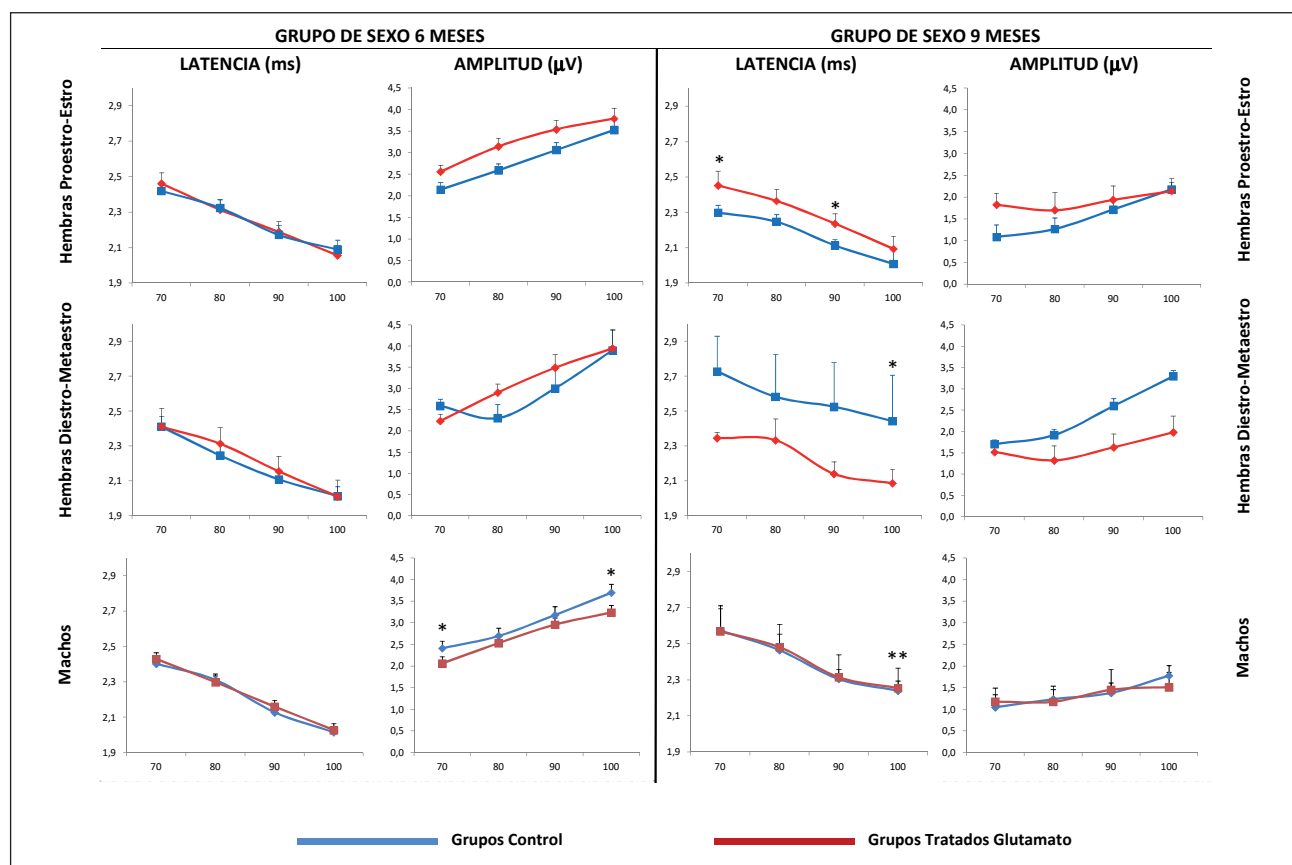


Figura 31: Efecto del tratamiento: En esta gráfica se representan los efectos producidos por el tratamiento en los dos grupos de edad, 6 meses (izquierda) respecto a los 9 meses (derecha) de machos y hembras respecto a los dos grupos de ciclo estral (grupo de proestro-estro y grupo de metaestro-diastro) en las hembras y los machos. Queda reflejado el efecto producido por el tratamiento con GMS, en cuanto a latencia (ms) y amplitud (μV) de la onda II para las intensidades de 70, 80, 90 y 100dB en los distintos grupos de animales. P-Valor > 0.05 = NS; * = $0.05 > P\text{-Valor} > 0.01$; ** = $0.01 > P\text{-Valor} > 0.001$; *** = $0.001 > p\text{-Valor}$.

- Onda III del PEATC:

En la onda III se observa el mismo esquema, que en las ondas anteriores, salvo por los machos de 6 meses en los que tras el tratamiento se hace muy significativa su pérdida de amplitud en la mayoría de intensidades analizadas.

Estudio del efecto del factor tratamiento

PEATC onda III (Ganglio Espiral Coclear)

EFFECTO DEL FACTOR TRATAMIENTO

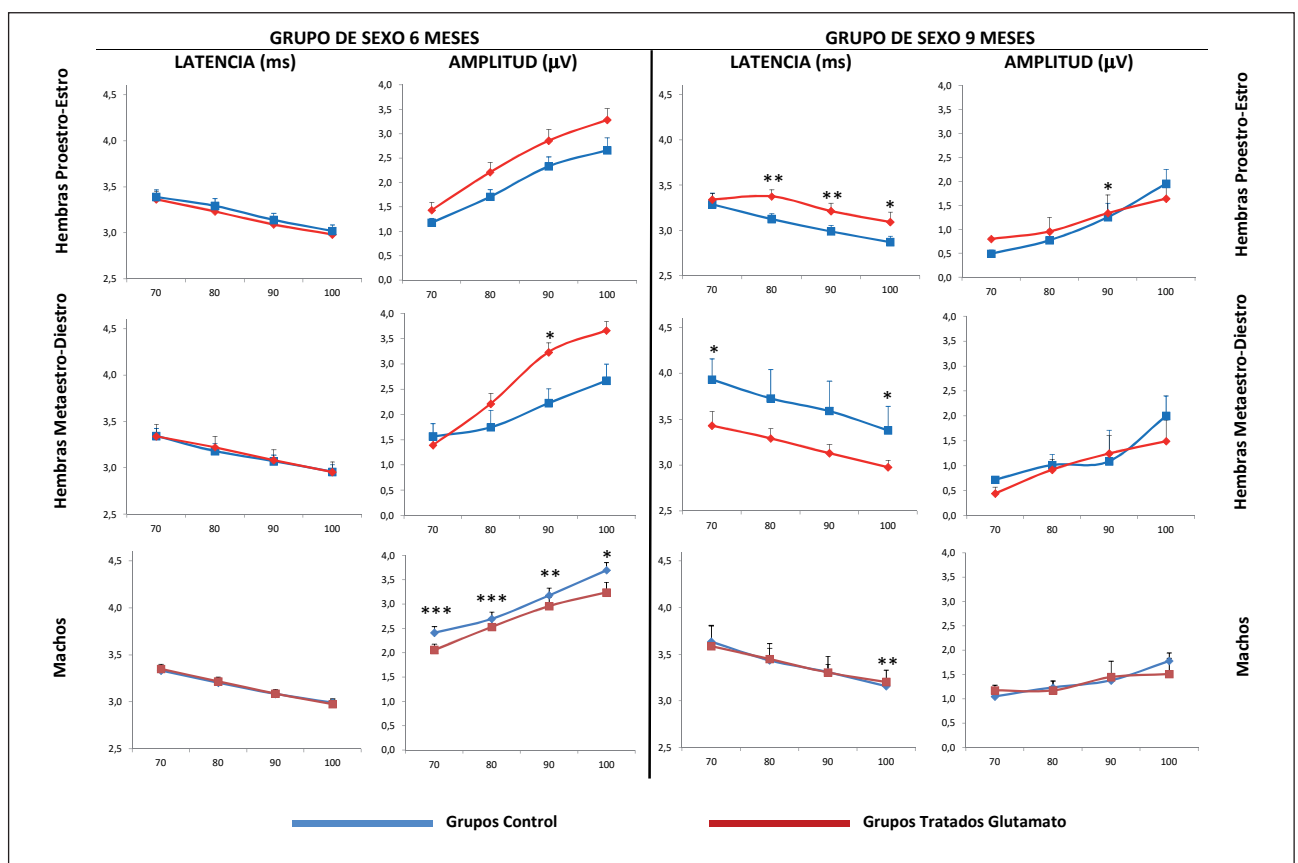


Figura 32: Efecto del tratamiento: En esta gráfica se representan los efectos producidos por el tratamiento en los dos grupos de edad, 6 meses (izquierda) respecto a los 9 meses (derecha) de machos y hembras respecto a los dos grupos de ciclo estral (grupo de proestro-estro y grupo de metaestro-diestro) en las hembras y los machos. Queda reflejado el efecto producido por el tratamiento con GMS, en cuanto a latencia (ms) y amplitud (µV) de la onda III para las intensidades de 70, 80, 90 y 100dB en los distintos grupos de animales. P-Valor > 0.05 = NS; * = 0,05 > P-Valor > 0.01; ** = 0.01 > P-Valor > 0.001; *** = 0.001 > p-Valor.

4.2. RESULTADOS MORFOLÓGICOS

4.2.1. Resultados de las tinciones histológicas

a) Tinción de cócleas con Hematoxilina-Eosina:

La tinción con esta técnica clásica se ha empleado en el presente estudio para observar las características y el estado general de la cóclea de cada animal, pudiendo detectar la presencia de neuronas del ganglio espiral y por lo tanto también su pérdida. Así, se puede evaluar, en este caso cualitativamente, la pérdida neuronal en cada una de las espiras modiulares del ganglio espiral co-clear que se produce de forma generalizada por el efecto de la edad, por el tratamiento con el agente excitotóxico GMS o combinando estos factores con la variabilidad debida al sexo del animal. De hecho, con esta tinción de hematoxilina-eosina se ha observado una disminución del número de neuronas en el ganglio espiral que se puede relacionar con la edad del animal, así como con el tratamiento de GMS y con la espira en la que se encuentre el ganglio fotografiado. Por ejemplo, los animales de 9 meses de todos los grupos de sexo y tratamiento, presentan una pérdida de neuronas más importante en la espira basal, que en los animales de 12 meses ya ha alcanzado la espira media, probablemente debido al proceso de presbiacusia que sufren a esta edad.

Evolución del efecto de la edad (Fig. 33):

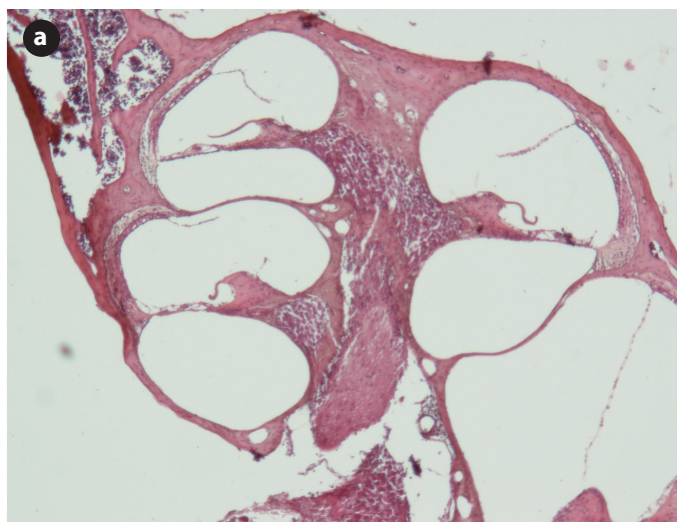
- a) *Hembra de 1 mes del grupo control* (Fig.33). Presenta intacto el órgano de Corti de las tres rampas. El ganglio espiral está en muy buen estado y se encuentra lleno de gran cantidad de neuronas cuyos axones bajan por el modiolo ocupando sus huecos óseos para formar el VIII par nervioso.
- b) *Hembra del grupo control de 12 meses de edad* (Fig.33). Se observa gran afectación producida por la presbiacusia. En su ganglio espiral las zonas basal y medial están prácticamente ausentes las neuronas y en el apical faltan la gran mayoría. Carece de órgano de Corti en todas las espiras, habiendo sido sustituido este por un engrosamiento de la membrana basilar a modo de cicatriz. En el modiolo no hay axones puesto que las neuronas se han perdido, dejando huecos óseos libres en su interior. Además, la estría vascular en la hembra de 12 meses presenta mayor edema en todas las espiras, lo que indicaría también su posible degeneración.

Figura 33: Evolución de los efectos analizados en la cóclea. Microfotografías de cortes histológicos midmodiulares de cócleas de ratón C57BL6J que representan los diferentes grupos de tratamiento. Cortes de parafina, 7µm, tinción de hematoxilina-eosina, barra de escala: 100µm. a, Hembra de 1 mes del grupo control; b, Hembra de 12 meses del grupo control; c, Hembra de 6 meses del grupo control; d, Hembra de 6 meses del grupo de tratados con GMS; e, Macho de 9 meses del grupo control; f, Hembra de 9 meses del grupo de tratados con GMS.

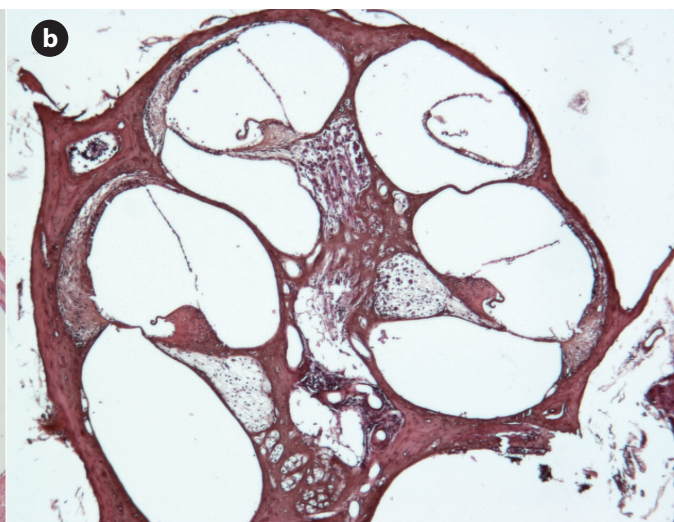
EVOLUCIÓN DE LOS EFECTOS ANALIZADOS EN LA CÓCLEA

Figura 33

EFFECTO DE LA EDAD

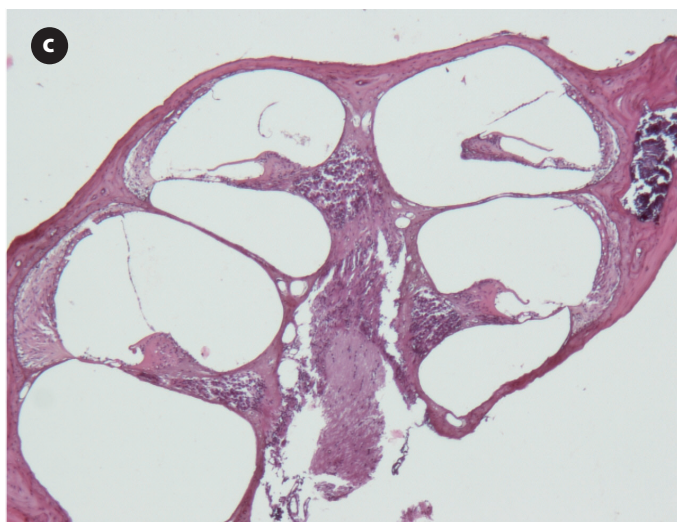


1 mes

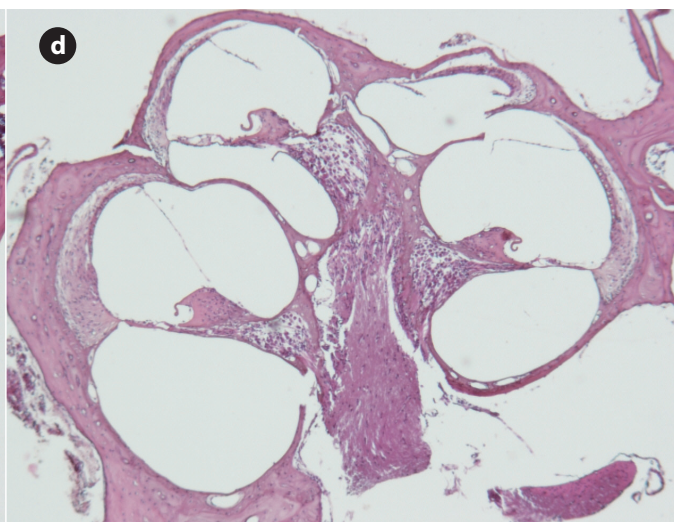


12 meses

EFFECTO DEL TRATAMIENTO

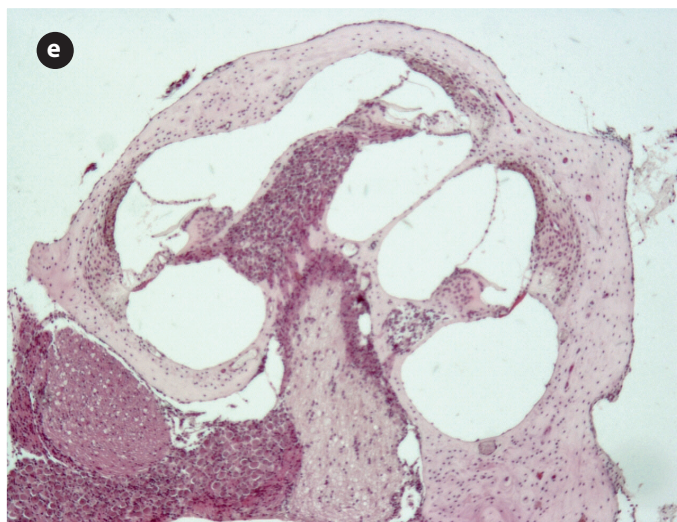


Control

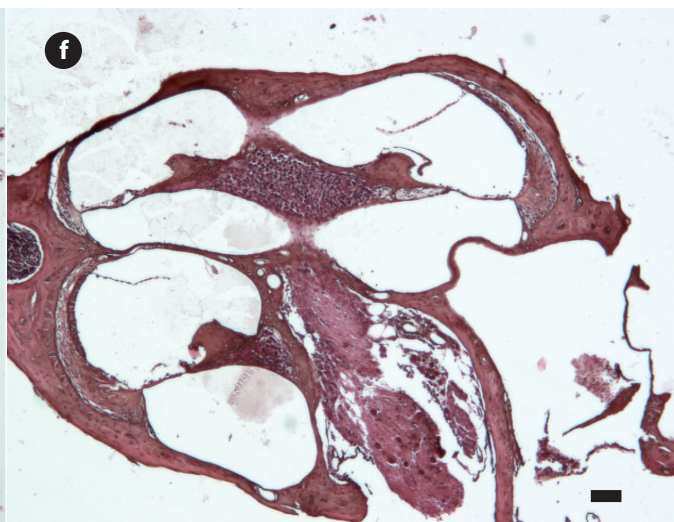


Tratado

EFFECTO DEL SEXO



Macho



Hembra

Evolución del efecto del GMS (Fig. 33):

c) *Hembra de 6 de edad meses del grupo control (Fig.33).*

d) *Hembra de 6 meses de edad del grupo de tratados con GMS (Fig.33).*

En ambas imágenes se observan unas cócleas en buen estado, propias de 6 meses de edad que aún no se han visto afectadas por el proceso de envejecimiento. Presentan gran cantidad de neuronas en el ganglio espiral de las tres espiras y los órganos de Corti y las estrías vasculares sin presencia de patologías. Por el contrario, en el caso de la cóclea del animal tratado se aprecia una disminución de las neuronas que es más importante en la espira apical y por igual en la basal y medial.

Evolución de la variabilidad debida al sexo (Fig. 33):

e) *Macho de 9 meses de edad del grupo control (Fig.33).*

f) *Hembra de 9 meses de edad del grupo control (Fig.33).*

La pérdida neuronal se observa en mayor medida en individuos del grupo de 9 meses de edad, en los que es mayor en el ganglio espiral basal del macho, y mientras que aun no se ha producido de forma tan evidente en la hembra y que se correlaciona también con la degeneración del órgano de Corti perteneciente a esta espira. En la hembra se observa la pérdida del órgano de Corti únicamente en la espira media, junto a una pérdida de fibras aferentes en el canal de Rosenthal, pero aun sin pérdida de neuronas aparente en el ganglio espiral de la escala media.

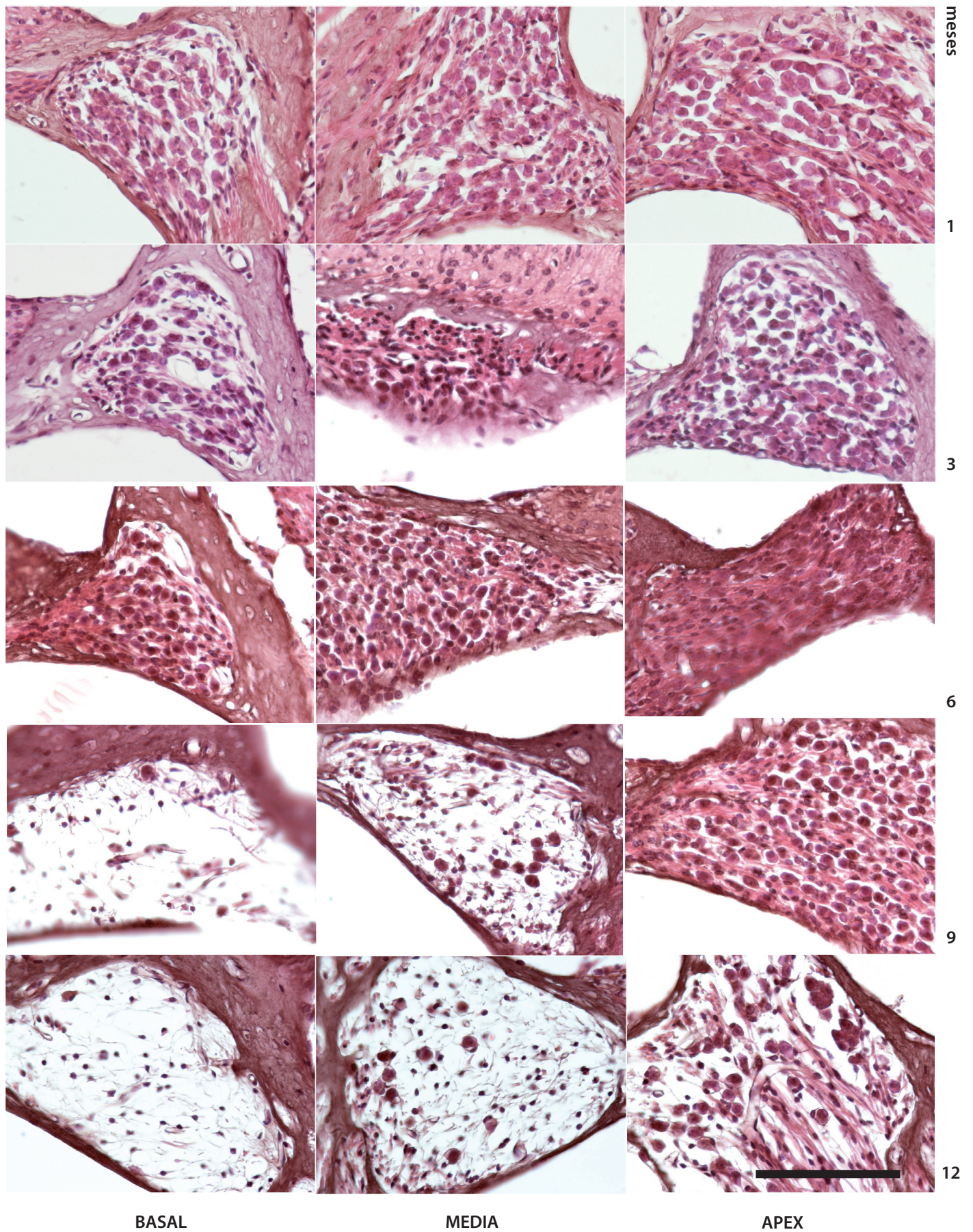
Grupo de Hembras Control:

En las hembras del grupo control de 1, 3 y 6 meses se observa que el ganglio espiral contiene la mayor parte de las neuronas en las tres espiras modiolares. Es en los animales de 9 y 12 meses donde se detecta una pérdida en el número de neuronas del ganglio espiral. En estos ratones la pérdida neuronal se detecta en la espira basal y medial, mientras que en la espira apical, el ganglio espiral aun conserva la mayor parte de ellas (Fig. 34).

Figura 34: Grupo de Hembras Control. Cuadro de microfotografías de cortes histológicos de ganglios espirales de las espiras basal, medial y apical, del grupo de hembras control de 1, 3, 6, 9 y 12 meses de edad. Cortes de parafina de 7 μm de grosor, con orientación midmodiolar, de cócleas de ratón C57BL6J teñidas con tinción de hematoxilina-eosina, barra de escala: 100 μm .

INMUNOHISTOQUÍMICA Hematoxilina-Eosina: GRUPO HEMBRAS CONTROL

Figura 34



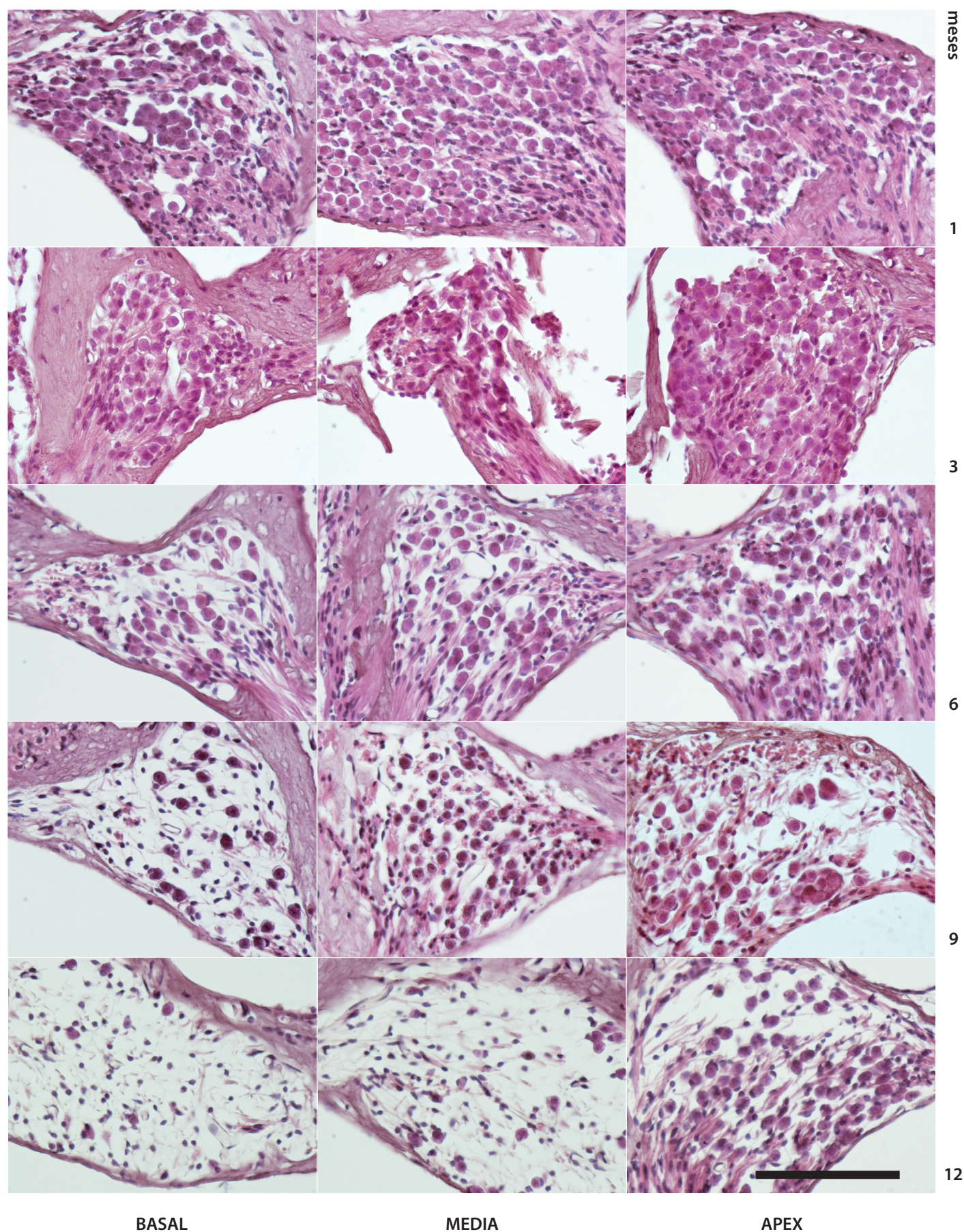
Grupo de hembras tratadas:

En las hembras del grupo tratado con GMS de 1 y 3 meses de edad, el ganglio espiral contiene la mayor parte de las neuronas en las tres espiras cocleares. Por otro lado, se observa una pérdida en el número de neuronas del ganglio en los animales de 6, 9 y 12 meses. En estos ratones la pérdida neuronal se detecta, sobre todo, en la espira basal y media, mientras que la apical aun conserva la mayor parte de ellas. Las ratonas parecen verse más afectadas por el tratamiento en función de su edad, presentando una pérdida neuronal progresiva en el ganglio espiral desde los 6 hasta los 12 meses, en los que se ven mucho más afectadas al haber una pérdida neuronal casi completa en las espiras basal y media y de forma grave en la espira apical (Fig 35).

Figura 35: Grupo de hembras tratadas. Cuadro de microfotografías de cortes histológicos de ganglios espirales de las espiras basal, medial y apical, del grupo de hembras de 1, 3, 6, 9 y 12 meses de edad tratadas con GMS. Cortes de parafina de 7µm. de grosor, con orientación midmodiolar, de cócleas de ratón C57BL6J teñidas con tinción de hematoxilina-eosina, barra de escala: 100 µm.

Hematoxilina-Eosina: GRUPO HEMBRAS TRATADAS

Figura 35



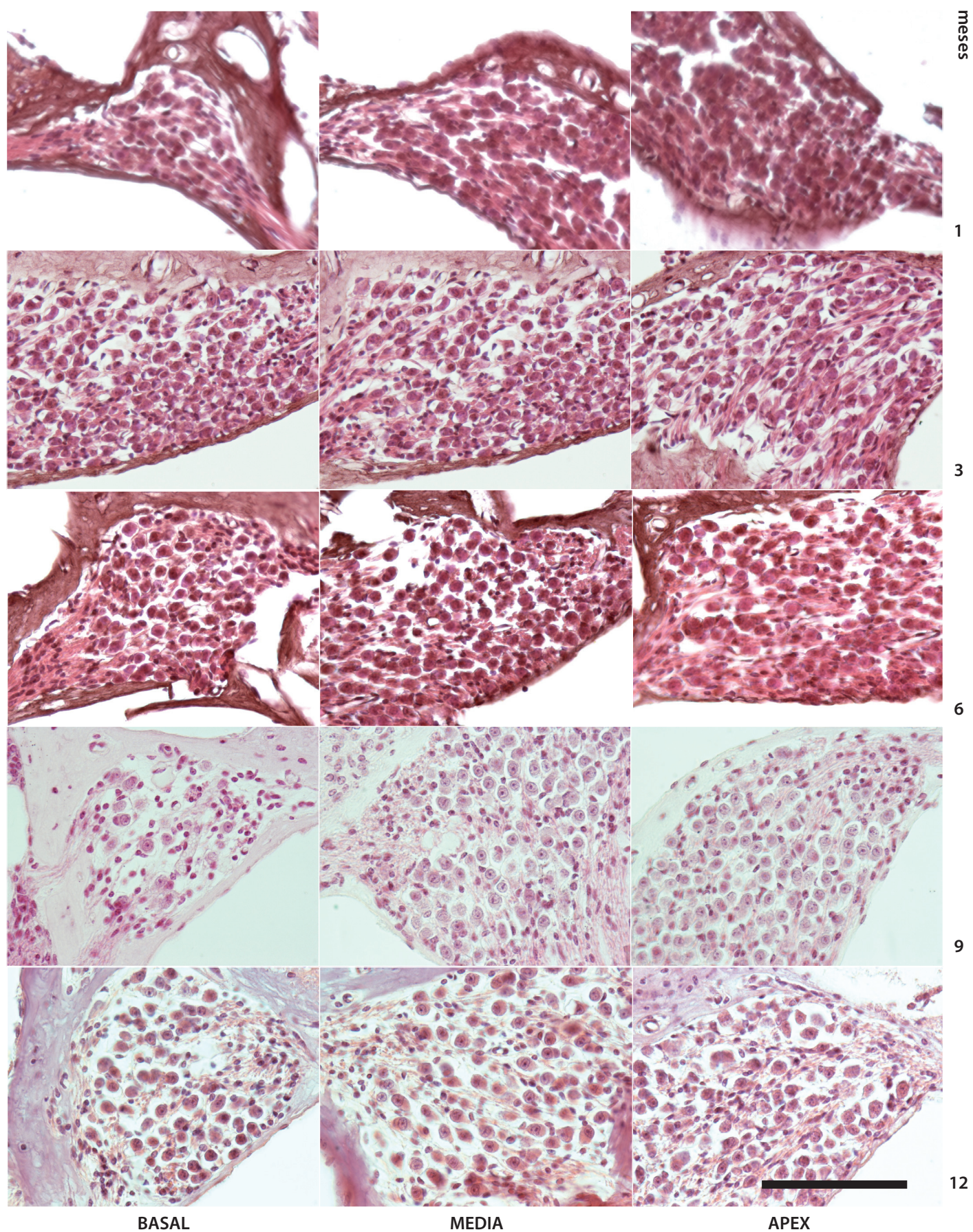
Grupo de machos control:

En los machos del grupo control de 1, 3 y 6 meses el ganglio espiral contiene la mayor parte de las neuronas en las tres espiras midmodiolares. Se observa, además, una pérdida en el número de neuronas en los animales de 9 y 12 meses, pero más leve que en el caso de las hembras estudiadas. En estos ratones la pérdida neuronal se detecta sobretudo en el animal de 12 meses, en la espira basal y media, mientras que el ganglio espiral, en la espira apical, aun conserva la mayor parte de ellas (Fig. 36).

Figura 36: Grupo de machos control. Cuadro de microfotografías de cortes histológicos de ganglios espirales de las espiras basal, medial y apical, del grupo de machos control de 1, 3, 6, 9 y 12 meses de edad. Cortes de parafina de 7µm de grosor, con orientación midmodiolar, de cócleas de ratón C57BL6J teñidas con tinción de hematoxilina-eosina, barra de escala: 100 µm.

Hematoxilina-Eosina: GRUPO MACHOS CONTROL

Figura 36



Grupo de machos tratados:

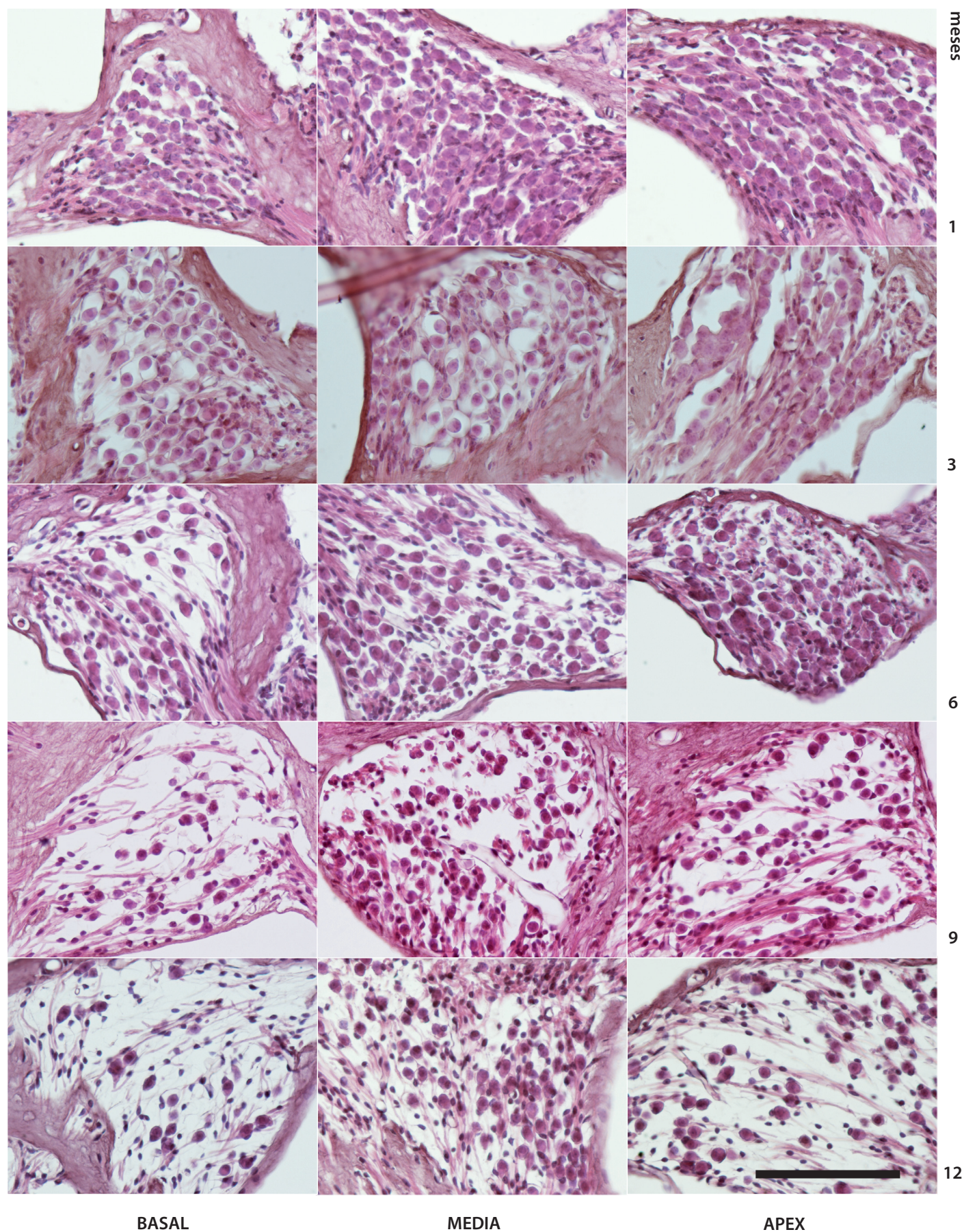
El grupo de machos tratados se caracteriza por presentar una pérdida neuronal en el ganglio espiral coclear que se puede apreciar desde los 3 meses de edad. A partir de este momento, el ganglio espiral ve reducido su número de neuronas en las tres espiras modiolares. Se observa también una pérdida en el número de neuronas en el ganglio espiral de los animales de 9 y 12 meses. En estos ratones la pérdida neuronal se detecta de forma homogénea en las tres espiras, siendo de más gravedad en los animales de mayor edad.

Es interesante el hecho de que, aunque las hembras parecen tener una mayor pérdida neuronal debida al proceso de excitotoxicidad, en el caso de los machos se ven afectados a una edad más temprana, detectándose ya en individuos de 3 meses, mientras que en las hembras el daño no es apreciable hasta los 6 meses de edad.

Figura 37: Grupo de machos tratados. Cuadro de microfotografías de cortes histológicos de ganglios espirales de las espiras basal, medial y apical, del grupo de machos de 1, 3, 6, 9 y 12 meses de edad tratados con GMS. Cortes de parafina de 7 μ m de grosor, con orientación midmodiolar, de cócleas de ratón C57BL6J teñidas con tinción de hematoxilina-eosina, barra de escala: 100 μ m.

Hematoxilina-Eosina: GRUPO MACHOS TRATADOS

Figura 37



b) Tinción del COS con violeta de cresilo:

CONTROL

TRATAMIENTO

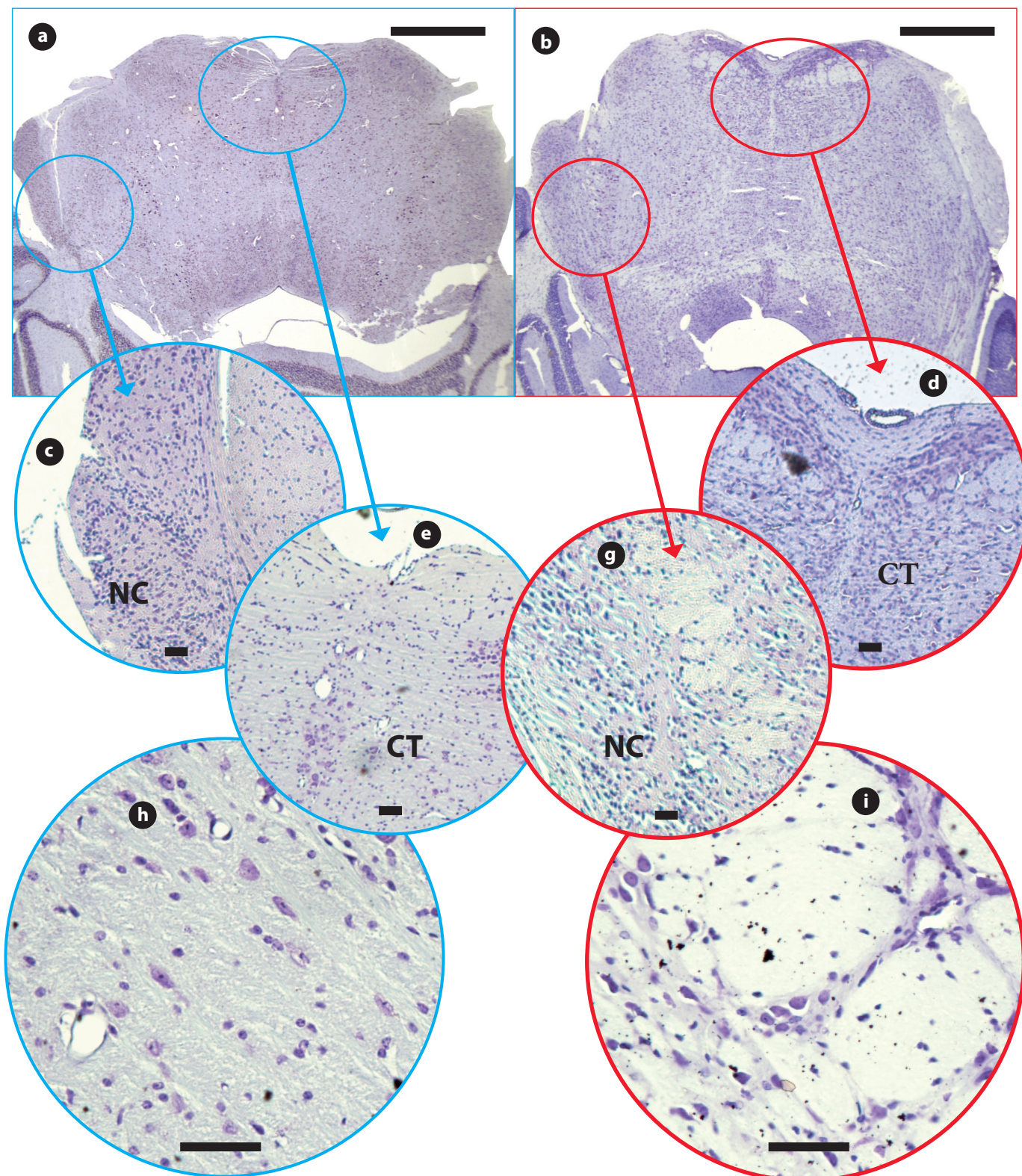


Figura 38: Efectos del tratamiento, sobre la estructura general del complejo olivar superior. Izquierda azul, **a:** Microfotografía de tronco cerebral de un animal sin tratamiento de GMS Barra de escala: 1mm; **c:** Detalle del núcleo coclear; **e:** Cuerpo Trapezoides **h:** Detalle del COS. Barras de escala: 100 μ m. Derecha rojo, **b:** Microfotografía de tronco cerebral de un animal tratado con GMS; **d:** Cuerpo Trapezoides afectado por el tratamiento con GMS; **g:** Detalle de edemas del núcleo coclear; **i:** Detalle de edemas en el COS . Barras de escala: 100 μ m.

El análisis de los cortes histológicos obtenidos de los diferentes grupos experimentales permitió establecer los efectos de los diferentes factores analizados en la presente Tesis Doctoral. Para ello se utilizó la tinción de violeta de Cresilo. Es un colorante acidófilo que tiñe el núcleo de las neuronas y el retículo endoplasmático rugoso (sustancia de Nissl), por lo que su uso es muy habitual en tinciones generales del sistema nervioso y permitió, en este caso, la observación de las características y el estado general de una porción de la vía auditiva, el complejo olivar superior (COS), de cada animal.

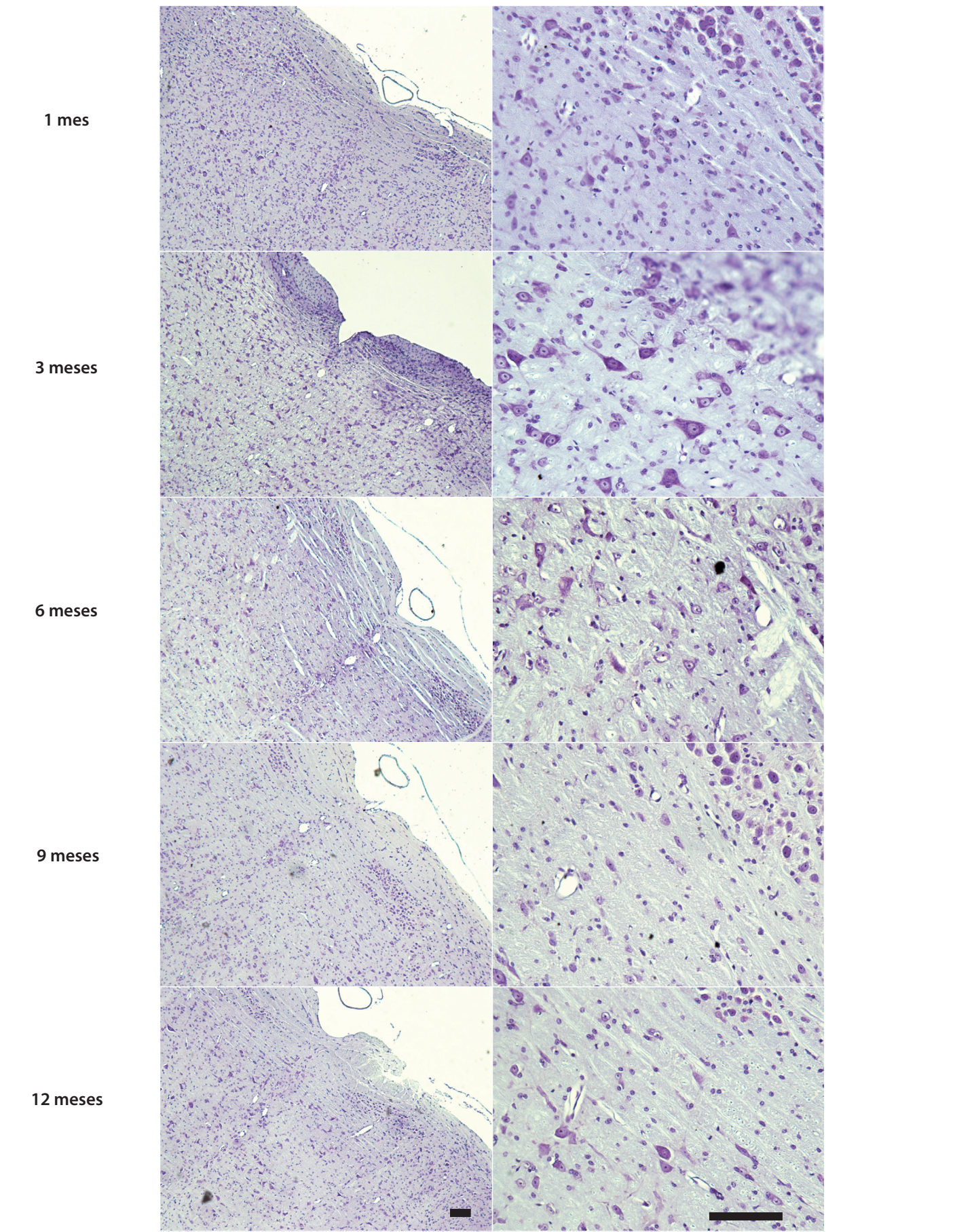
Se seleccionaron secciones coronales del tronco cerebral de cada grupo de edad, sexo y tratamiento, para poder observar el estado de la vía auditiva en los núcleos del complejo olivar superior.

Tras el análisis de las imágenes obtenidas, se han detectado alteraciones en el tejido nervioso, con apariencia de edemas en los animales tratados con GMS, tanto en el grupo de hembras como el de machos. Estas formaciones edematosas, que parecen acarrear una pérdida de neuronas dentro de estas estructuras globosas y la posible presencia de astrocitos edematosos en el interior de las mismas (Fig. 38), se encontraron en el tronco cerebral, en la zona del complejo olivar superior (COS), sobretudo en la zona de la oliva superior lateral (OSL) y medial (OM) del COS, en el NMCT (núcleo medial del cuerpo trapezoides). Estas alteraciones no se observaron en las preparaciones microscópicas obtenidas de los animales del grupo control. Tampoco se pudieron detectar diferencias en las estructuras morfológicas dependientes de la edad o del sexo del animal analizado.

Figura 39 a 42 (pág. posteriores): Efectos del tratamiento, edad y sexo sobre la estructura del COS. Microfotografías obtenidas de cortes histológicos de 7 μ m de tronco cerebral de ratones C57BL6J de los diferentes grupos experimentales teñidos con una tinción simple de Violeta de Cresilo. En los animales del grupo de tratamiento con GMS se observan unas formaciones globosas de apariencia edematosa, con ausencia de neuronas a la altura del COS ipsi- y contralateral. Izquierda: Imágenes de las secciones histológicas a bajo aumento, barra de escala: 100 μ m. Derecha: Detalles de las zonas afectadas en los mismos cortes histológicos a medio aumento, barra de escala: 100 μ m.

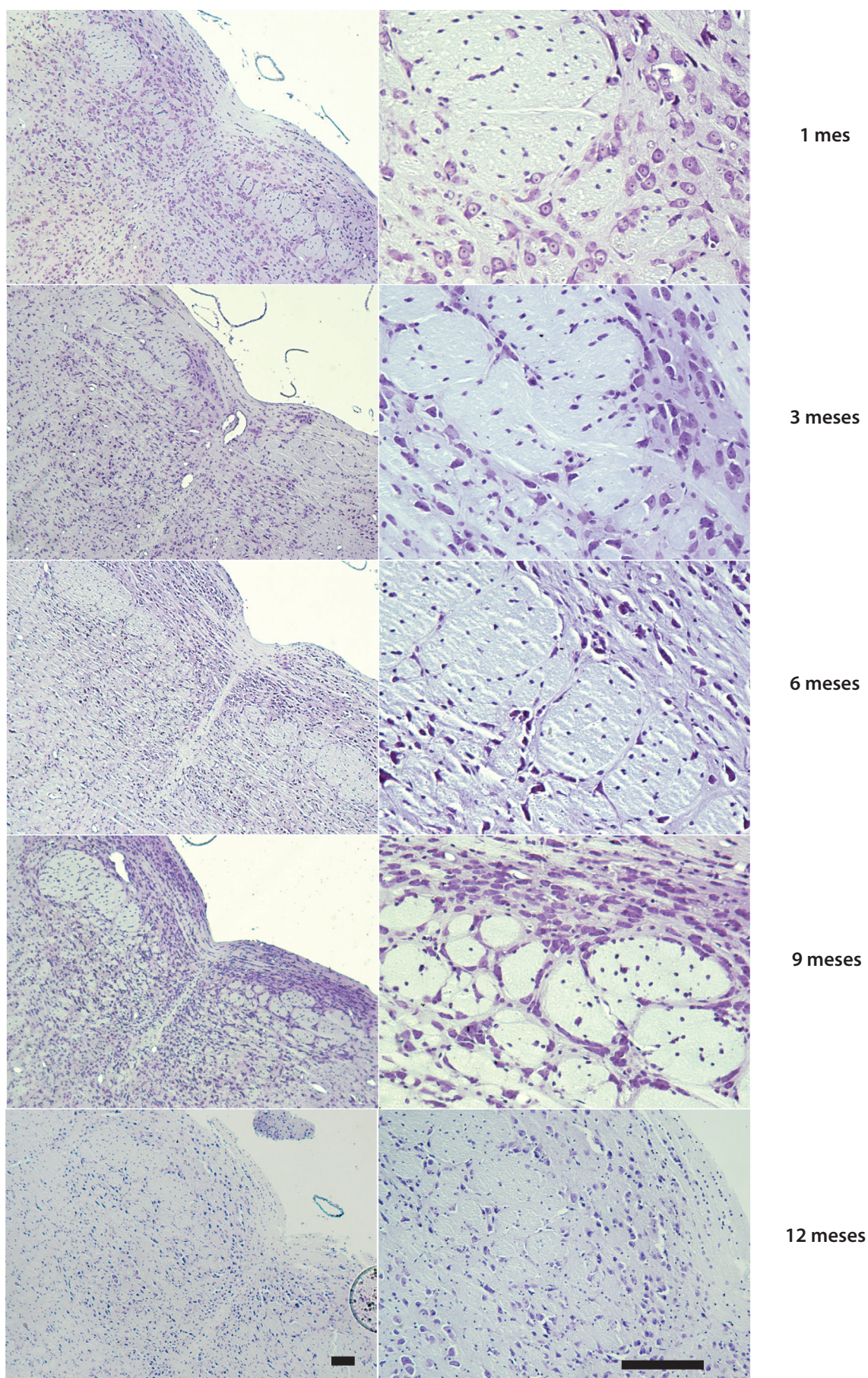
COS-Violeta Cresilo: GRUPO HEMBRAS CONTROL

Figura 39



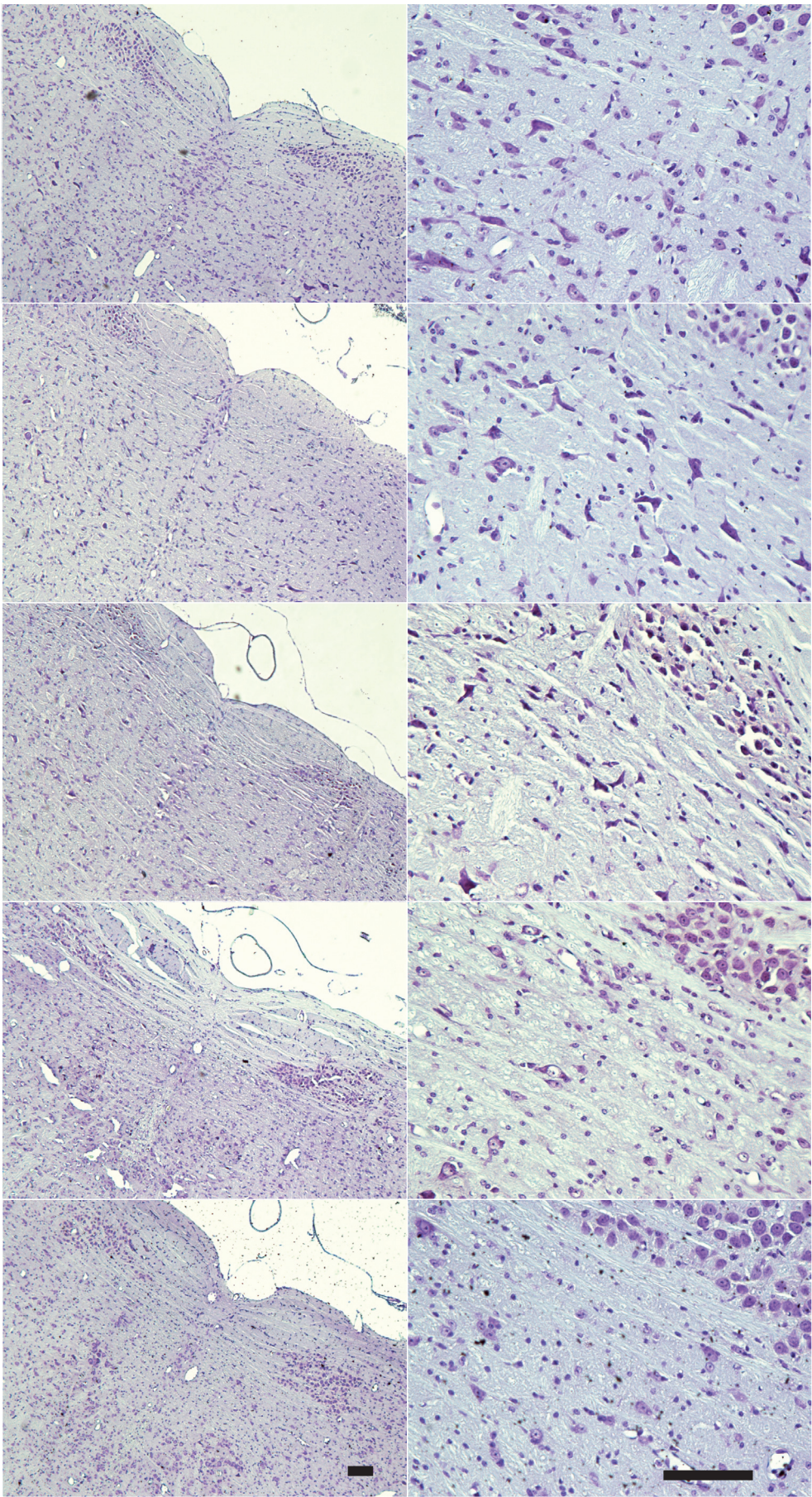
COS-Violeta Cresilo: GRUPO HEMBRAS TRATADAS

Figura 40



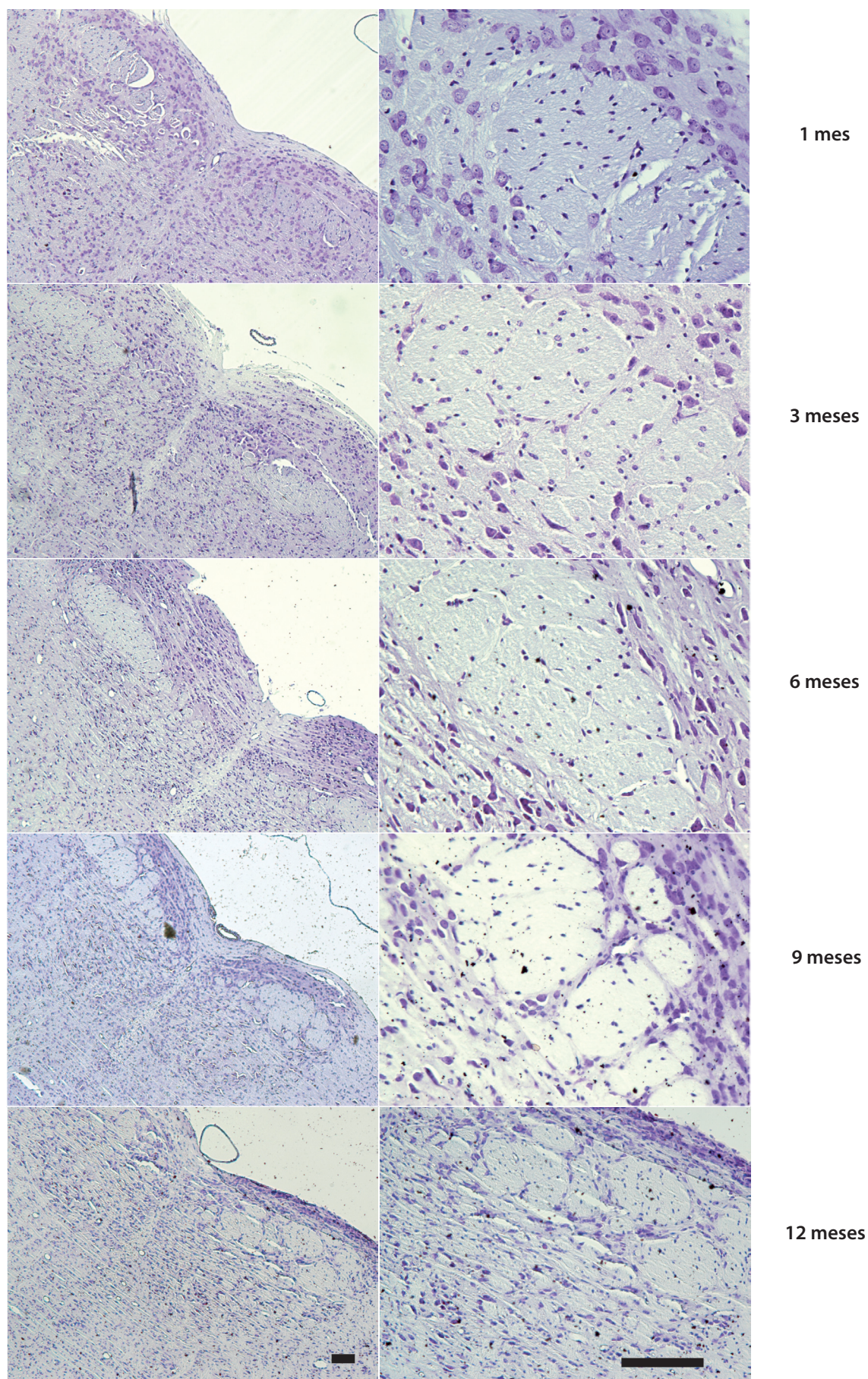
COS-Violeta Cresilo: GRUPO MACHOS CONTROL

Figura 41



COS-Violeta Cresilo: GRUPO MACHOS TRATADOS

Figura 42



4.2.2. Resultados de las técnicas de inmunohistoquímica Efectos del tratamiento, edad y sexo sobre la estructura

La detección y la valoración cualitativa de la expresión en la cóclea de los antígenos que se han estudiado en esta Tesis Doctoral mediante inmunohistoquímica se ha realizado, tal y como se especifica en el apartado de material y métodos, seleccionando cortes histológicos de la zona midmodiolar coclear de cada grupo de edad, de sexo y de tratamiento con GMS.

a) Detección inmunohistoquímica de Caspasa 3:

La caspasa 3 es una proteína apoptótica que se encuentra latente como zimógeno en el citosol de las células hasta que se activa para provocar apoptosis o muerte celular. La vía intrínseca de señalización de apoptosis, depende de la disfunción mitocondrial, que permite la permeabilización de la membrana mitocondrial para que salga el citocromo C al citosol y la consiguiente activación de caspasas efectoras, como la caspasa 3, que generará daño proteolítico y posteriormente desencadena daño nuclear y fragmentación del ADN ([Zhengde Du, 2015](#)).

De manera general, los cortes histológicos de las cócleas estudiadas presentan marcaje positivo para la inmunohistoquímica con anti-caspasa 3 (Fig. 43 a 46). Se ha observado que el marcaje es más abundante en las cócleas de los animales con mayores alteraciones, puesto que, como se ha indicado anteriormente, es un marcador de muerte celular.

Este marcaje positivo se observó tanto en las dendritas de las neuronas del ganglio espiral como en sus somas, así como en diferentes células del órgano de Corti, tanto en las células sensoriales como en las de soporte, en algunos grupos experimentales.

En el caso de los animales pertenecientes a los grupos control, presentan un marcaje aparentemente relacionado con la edad del animal, pero que también difiere dependiendo de su sexo.

Así, los machos presentan un marcaje más abundante, que comienza a los 3 meses y se correlaciona con la edad del animal estudiado. Los animales de 1 mes, presentan marcaje, que se evidencia con más extensión con el aumento de la edad hasta los animales de 9 meses donde se alcanza su mayor grado de expresión. A los 12 meses prácticamente no hay marcaje de células apoptóticas. Este proceso se da en animales controles y tratados, pero es más acusado en el caso de los animales tratados con GMS.

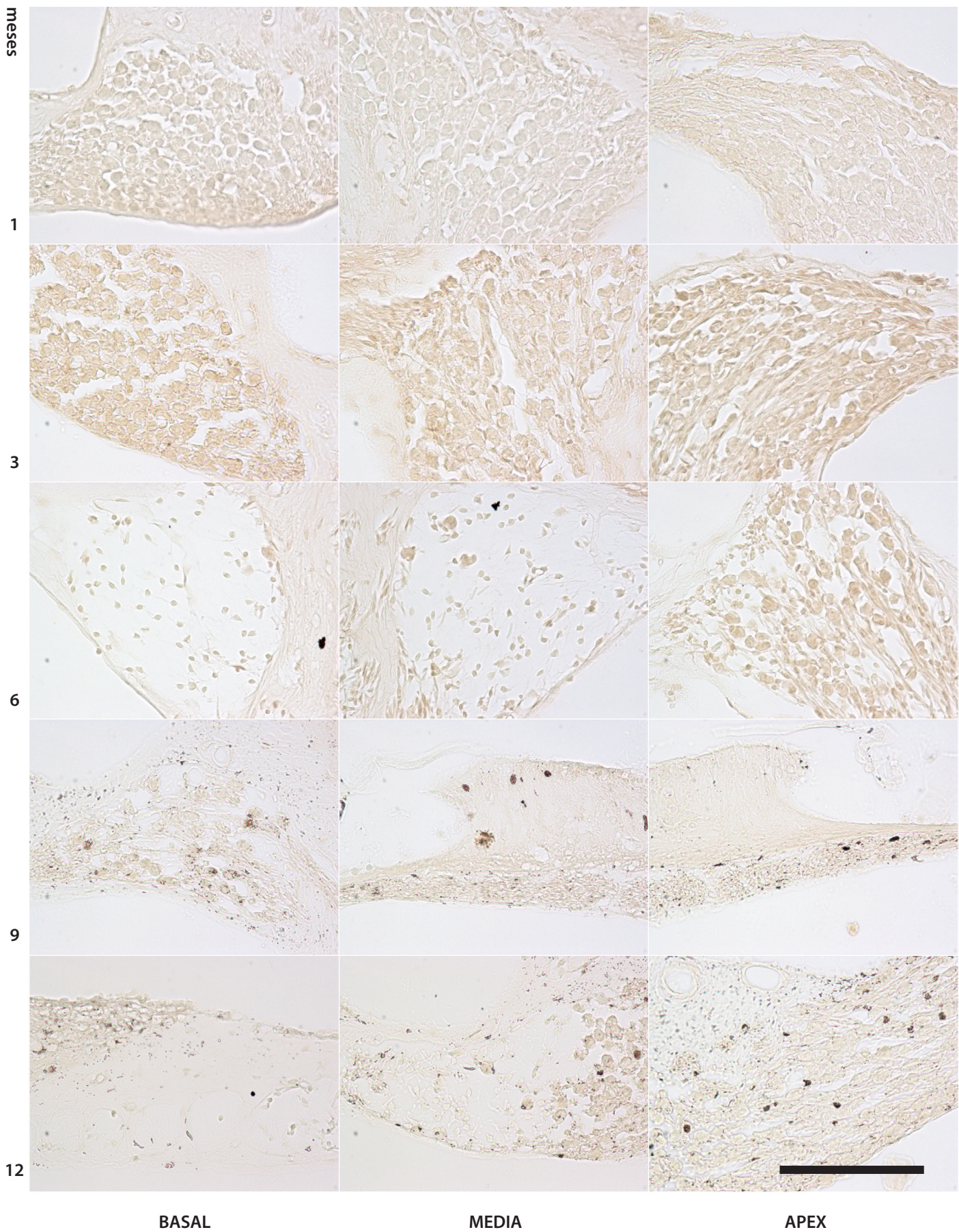
En cambio, en las hembras parece que se da un proceso muy distinto. En ellas no existe prácticamente marcaje de muerte celular con anticuerpo anti-caspasa 3 hasta los 9 y 12 meses de edad, encontrando más positivos en el ganglio espiral a los 12 meses de edad y en todas las espiras, donde el proceso es similar.

Los animales tratados con GMS presentan una mayor expresión de caspasa 3 a partir de los 6 meses de edad tanto en hembras como en machos, pero en el caso de las hembras, parece que esta expresión se inicia cuando solo tienen 1 mes, mientras que en los machos casi no hay marcaje a esa edad. A los 3 meses y en ambos sexos, no se evidencia una cantidad significativa de expresión de caspasa 3. Pero de 6 a 9 meses el marcaje es muy positivo en todas las espiras y en ambos grupos.

Figura 43 a 46 (pág. posteriores): DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CASPASA 3. Cuadros de microfotografías de cortes histológicos, en orientación midmodiolar, de 7 μm en parafina procedentes de cócleas de ratón C57BL6J en sección midmodiolar. Las imágenes, tomadas a gran aumento, se corresponden con los ganglios espirales de las espiras basal, medial y apical, de los grupos de hembras y machos y de tratamiento, de 1, 3, 6, 9 y 12 meses de edad. Barra de escala: 100 μm .

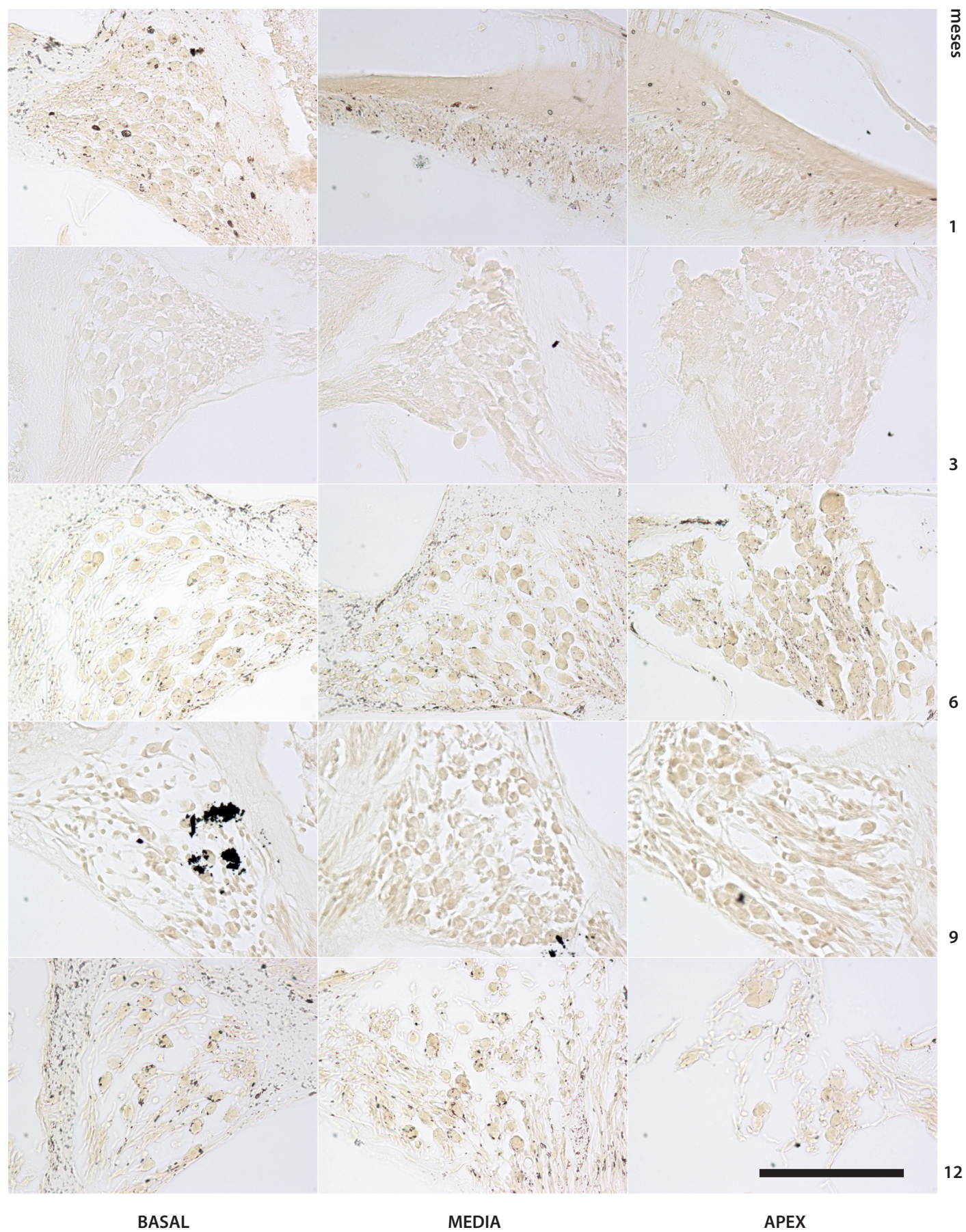
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Caspasa3: GRUPO HEMBRAS CONTROL

Figura 43



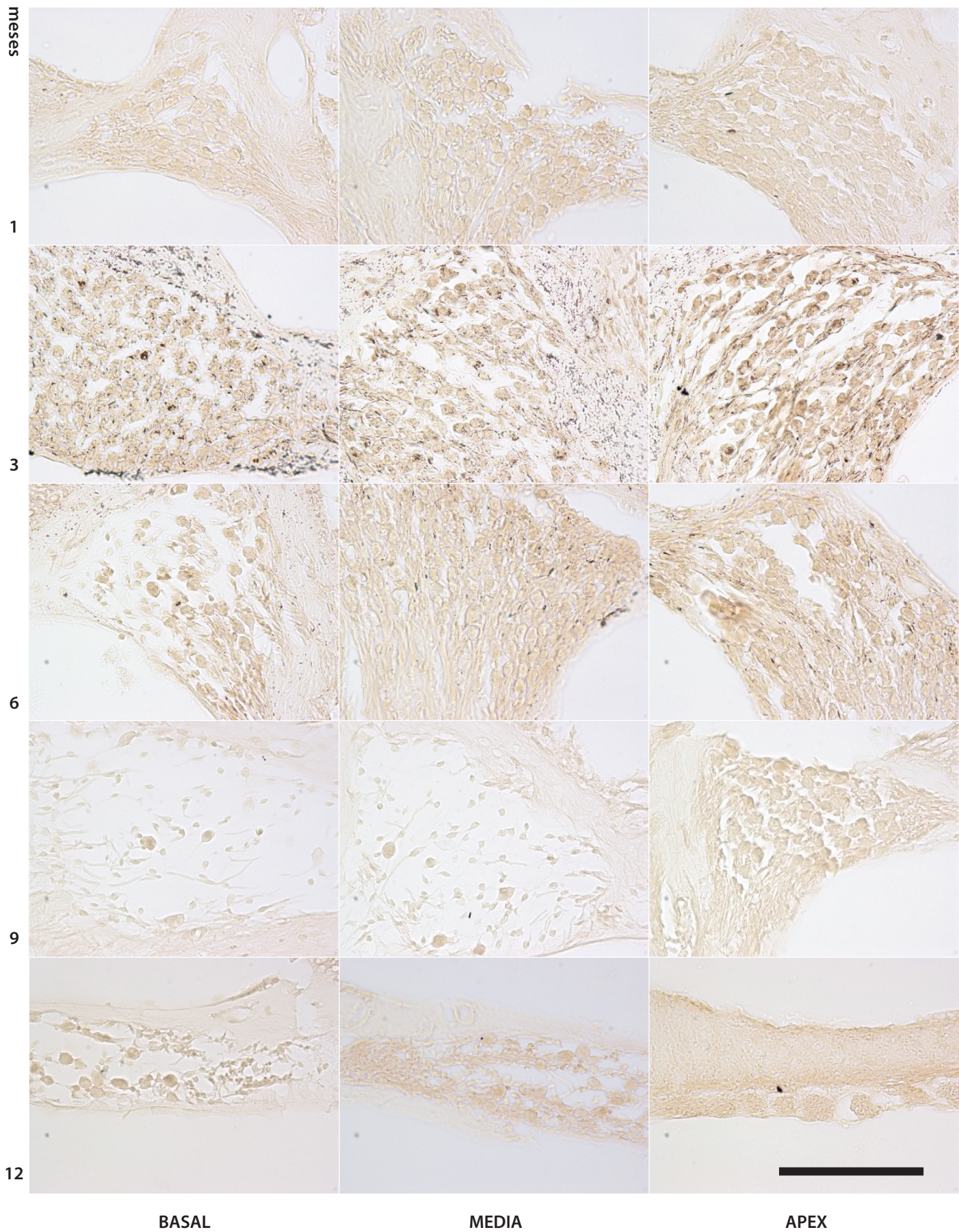
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Caspasa3: GRUPO HEMBRAS TRATADAS

Figura 44



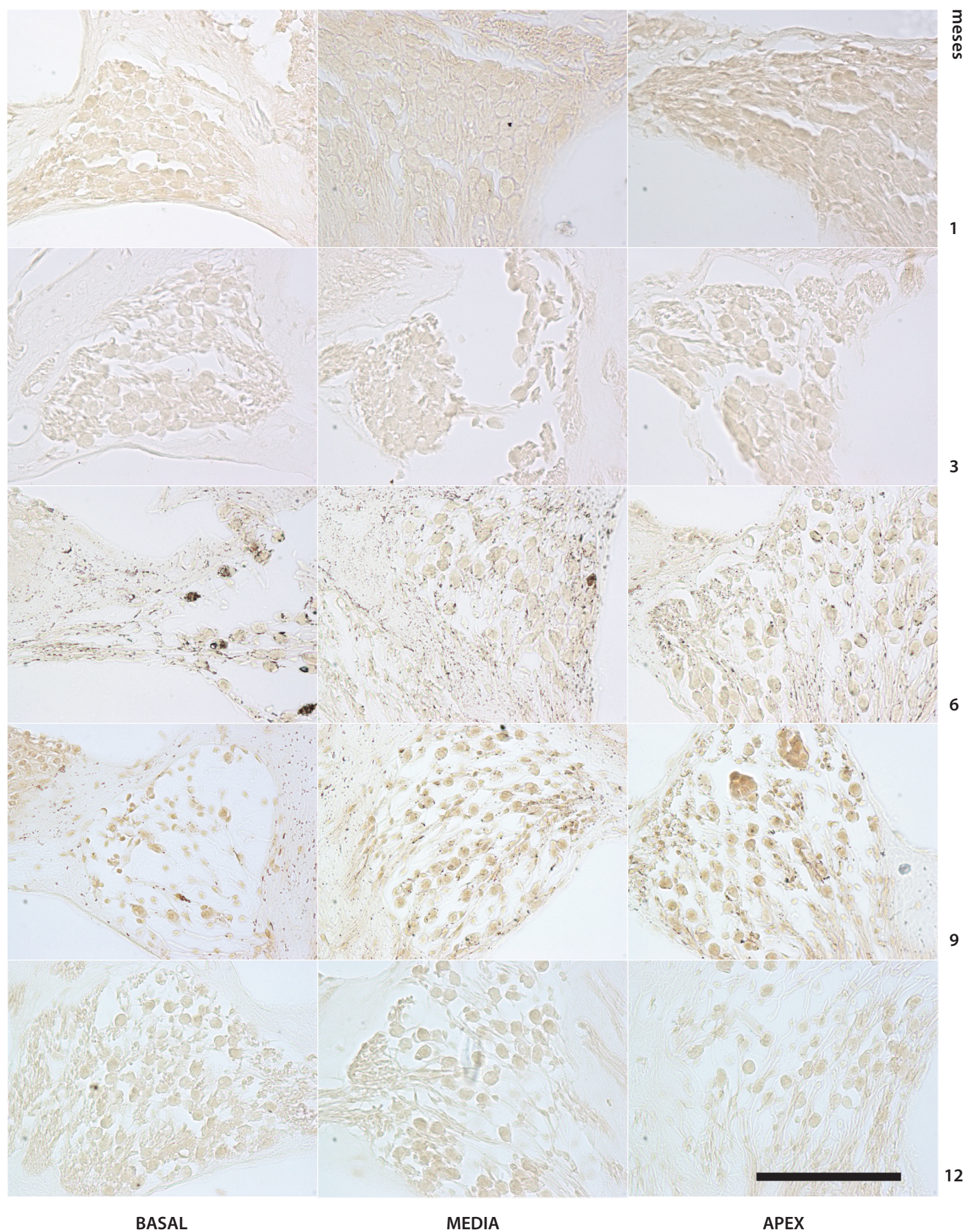
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Caspasa3: GRUPO MACHOS CONTROL

Figura 45



INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Caspasa3: GRUPO MACHOS TRATADOS

Figura 46



b) Detección inmunohistoquímica de Caspasa 9:

La caspasa 9 para activarse, requiere la formación del apoptosoma en el citosol de las células apoptóticas. Es por tanto un buen indicador de la apoptosis por vía intrínseca o mitocondrial (Nevado, et al., 2006).

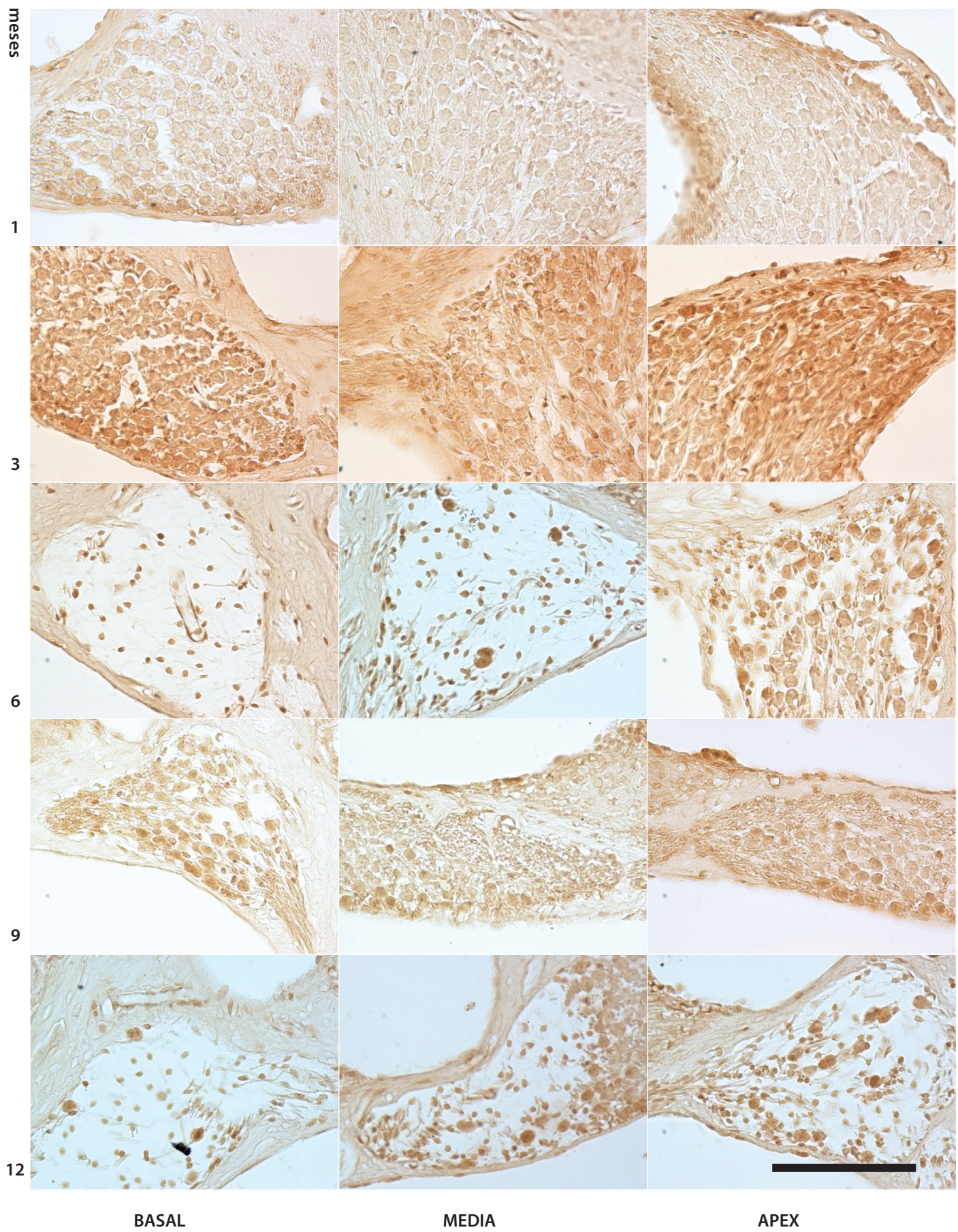
En los animales tratados con GMS se observa un marcaje muy extendido, tanto en las fibras nerviosas, como en los somas de las neuronas, así como en el receptor auditivo y sus células sensoriales, indicando, por tanto, la presencia de gran cantidad de células apoptóticas en los grupos tratados con GMS. En estos animales se encontró marcaje sobre todo a los 3, 9 y 12 meses y más en el caso de los machos que en las hembras, que con 1 mes de edad, presentan muy poco marcaje. La edad con un mayor marcaje de apoptosis es 9 meses y más en los machos que en las hembras. En cuanto a los grupos control, los machos control si presentan un marcaje positivo en todas las edades, equivalente al encontrado en las hembras tratadas e incluso mayor en edades de 3 y 6 meses.

Los animales del grupo control presentaron muy poco marcaje en general, pero se observa marcaje positivo, a los 3 meses (más en machos que en hembras) y a partir de los 6 meses un poco más abundante, hasta los 9 meses. A los 12 meses de nuevo las muestras vuelven a estar muy poco marcadas recuperando los valores de marcaje de los primeros meses de vida.

Figura 47 a 50 (pág. posteriores): DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CASPASA 9. Cuadros de microfotografías de cortes histológicos, en orientación midmodiolar, de 7 μm en parafina procedentes de cócleas de ratón C57BL6J en sección midmodiolar. Las imágenes, tomadas a gran aumento, se corresponden con los ganglios espirales de las espiras basal, medial y apical, de los grupos de hembras y machos y de tratamiento, de 1, 3, 6, 9 y 12 meses de edad. Barra de escala: 100 μm .

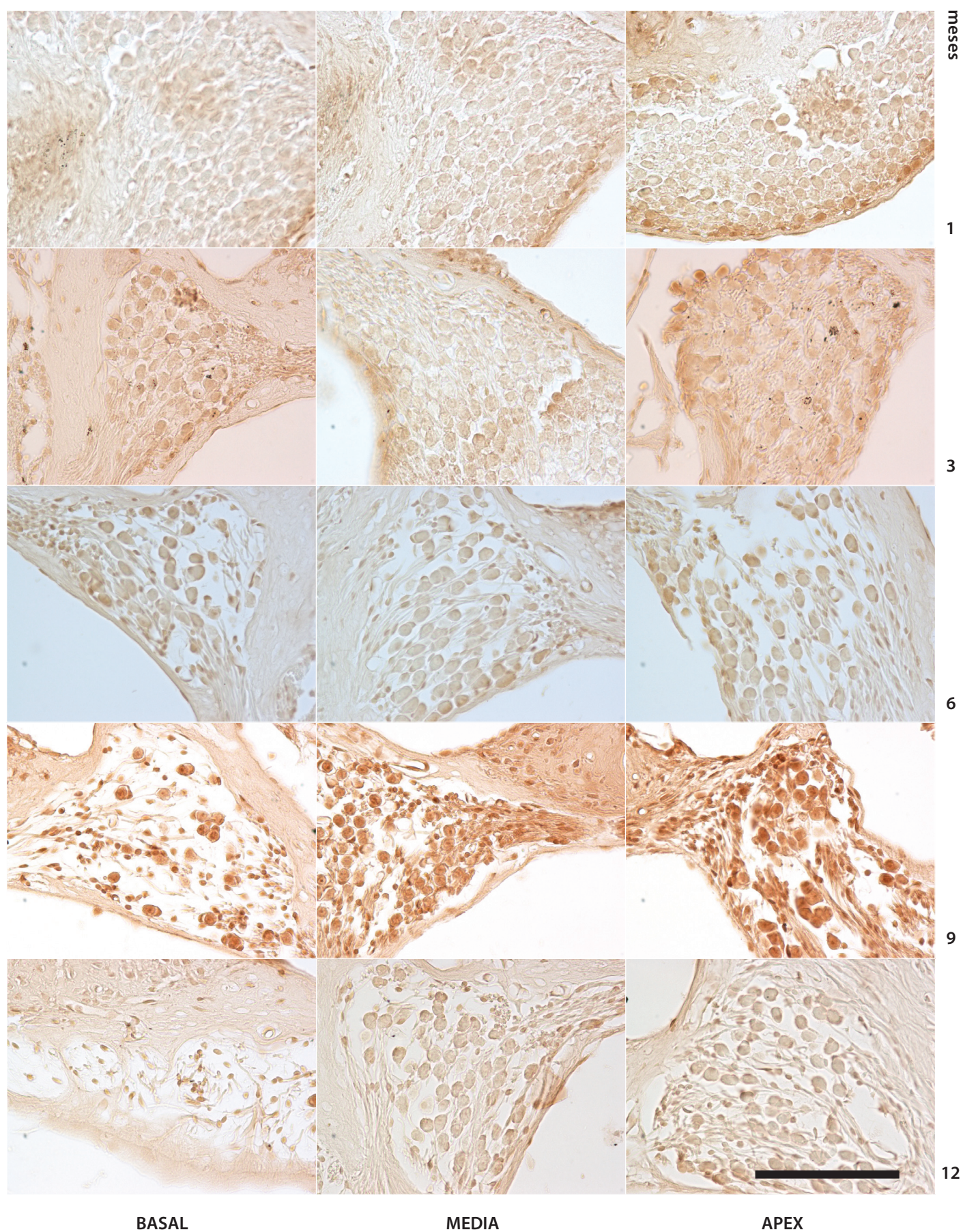
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Caspasa9: GRUPO HEMBRAS CONTROL

Figura 47



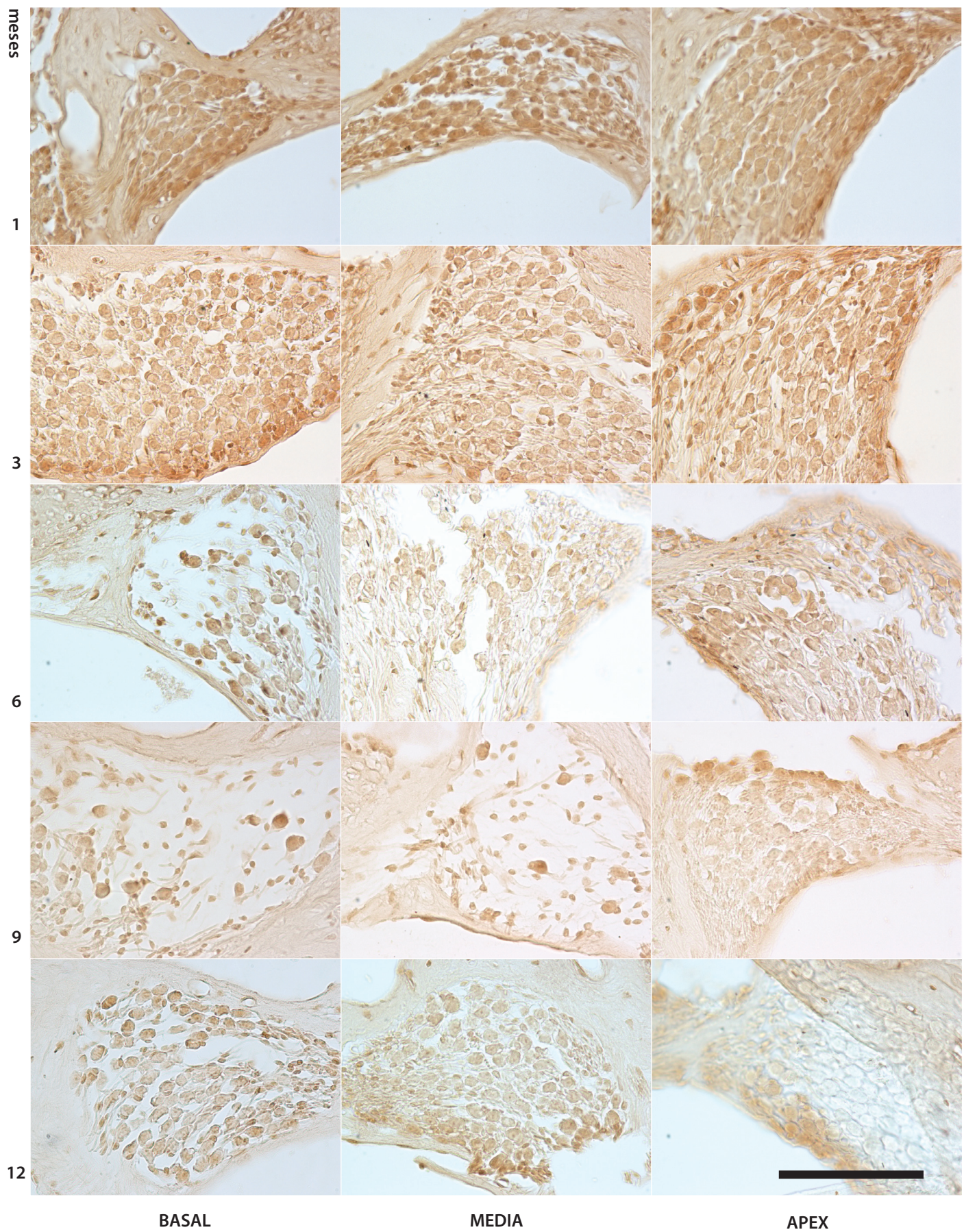
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Caspasa9: GRUPO HEMBRAS TRATADAS

Figura 48



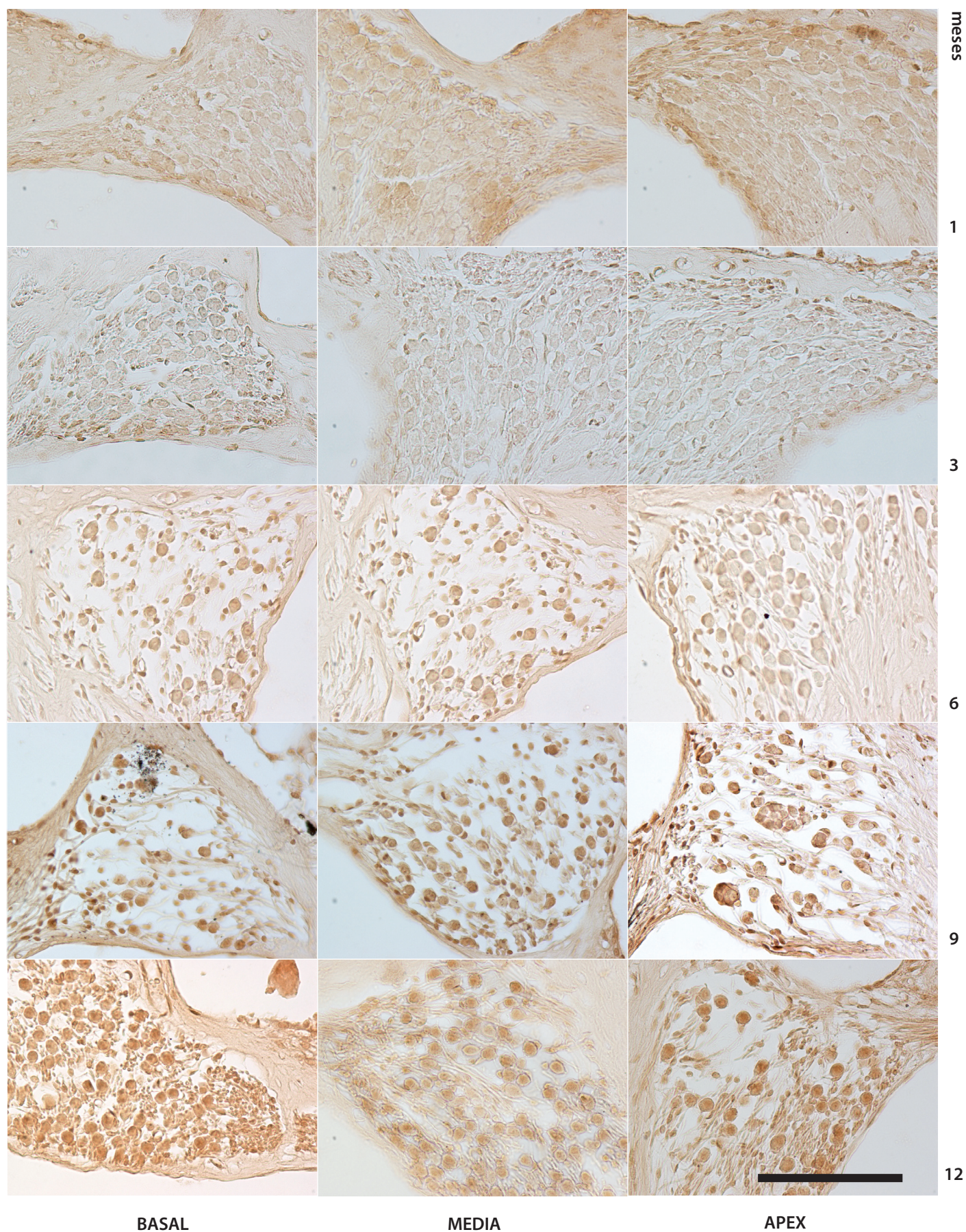
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Caspasa9: GRUPO MACHOS CONTROL

Figura 49



INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Caspasa9: GRUPO MACHOS TRATADOS

Figura 50



c) Detección inmunohistoquímica de Caspasa 8:

Esta caspasa está presente en los procesos de muerte celular producida por un proceso inflamatorio y se ha utilizado para valorar la posible apoptosis extrínseca que tendría lugar por efecto de la excitotoxicidad producida por el tratamiento con GMS ([Nicotera, 2003](#)).

En general no existe mucho marcaje en el ganglio espiral coclear con anti-caspasa 8, sobre todo se presenta más marcaje en el grupo de machos.

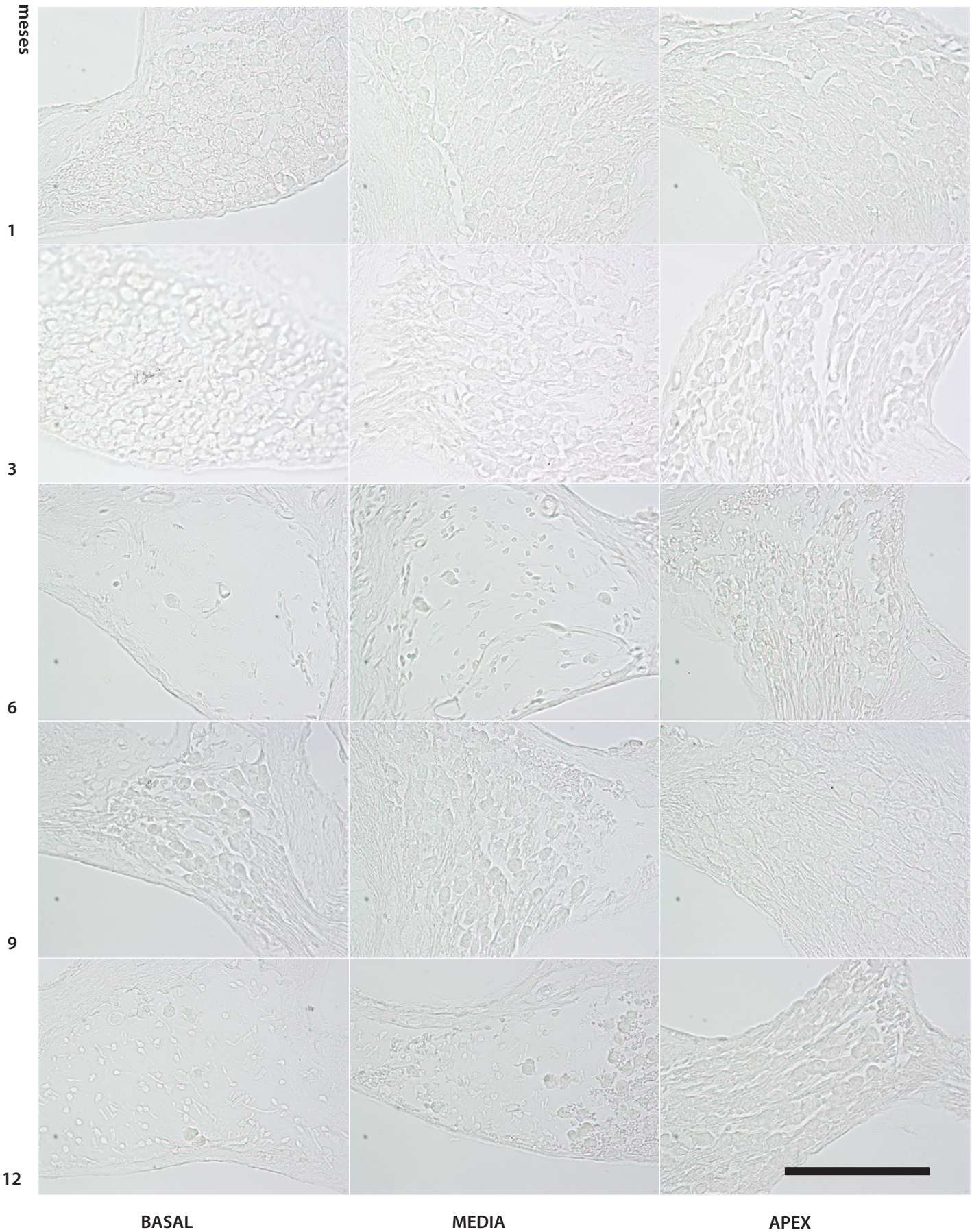
Así, en los machos control hay marcaje en la espira basal y en la medial, mientras que no hay positivos en la apical, salvo a los 12 meses. Los machos tratados con GMS parecen aumentar su marcaje positivo en todas las espiras. Las hembras control presentan positivos en todas las edades, salvo en 1 mes, siendo muy marcado este positivo en la espira basal a los 9 y 12 meses, mientras que las hembras tratadas con GMS parecen disminuir la presencia de Caspasa 8 en la espira medial y apical, manteniendo los positivos solo en 3 y 6 meses en la espira basal.

Las hembras tratadas no presentan marcaje con anti-caspasa 8 en la espira media mientras que en las hembras control solo aparece en la espira apical de la hembra de 9 meses.

Figuras 51 a 54 (pág. posteriores):DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CASPASA 8. Cuadros de microfotografías de cortes histológicos, en orientación midmodiolar, de 7 μm en parafina procedentes de cócleas de ratón C57BL6J en sección midmodiolar. Las imágenes, tomadas a gran aumento, se corresponden con los ganglios espirales de las espiras basal, medial y apical, de los grupos de hembras y machos y de tratamiento, de 1, 3, 6, 9 y 12 meses de edad. Barra de escala: 100 μm .

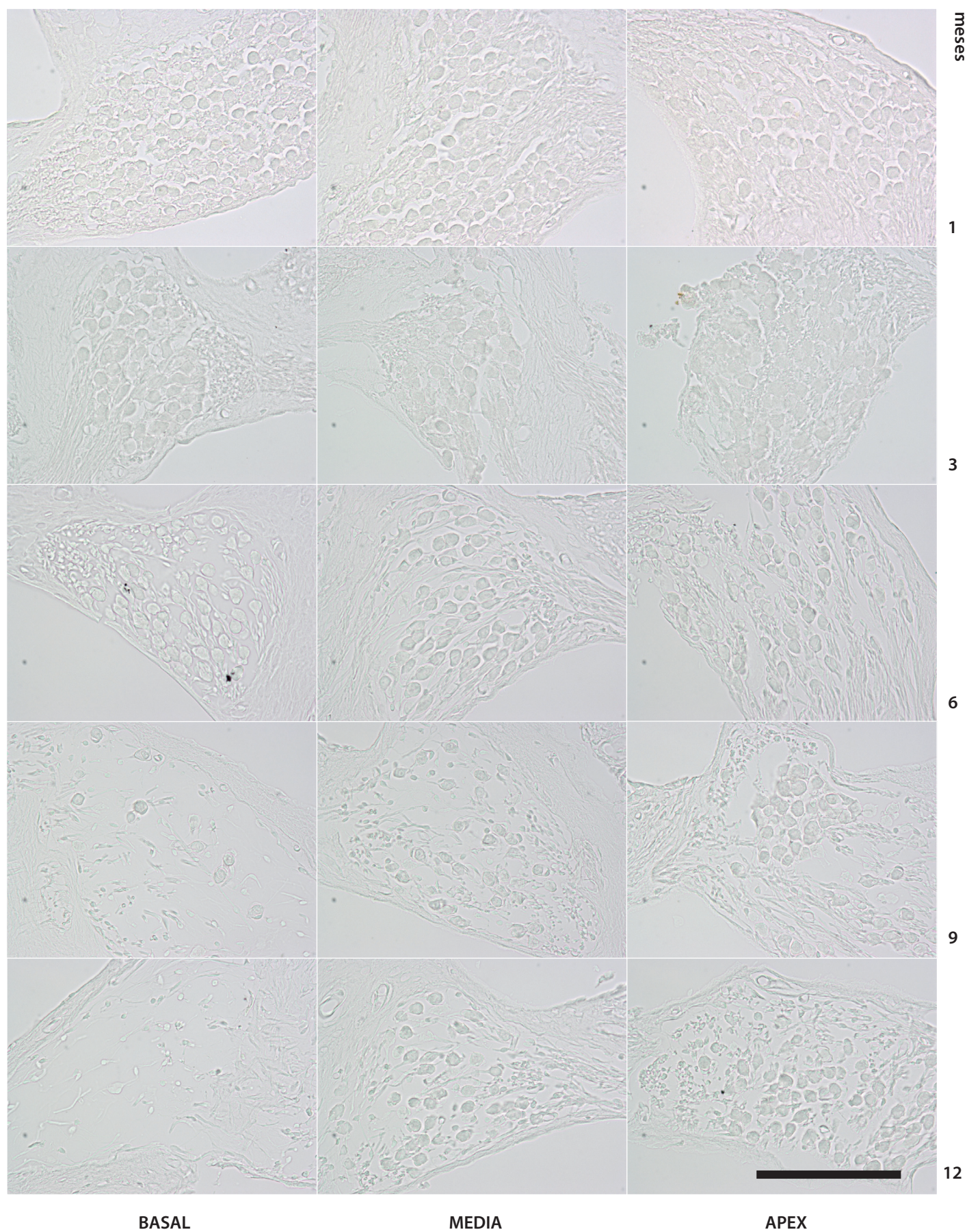
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Caspasa8: GRUPO HEMBRAS CONTROL

Figura 51



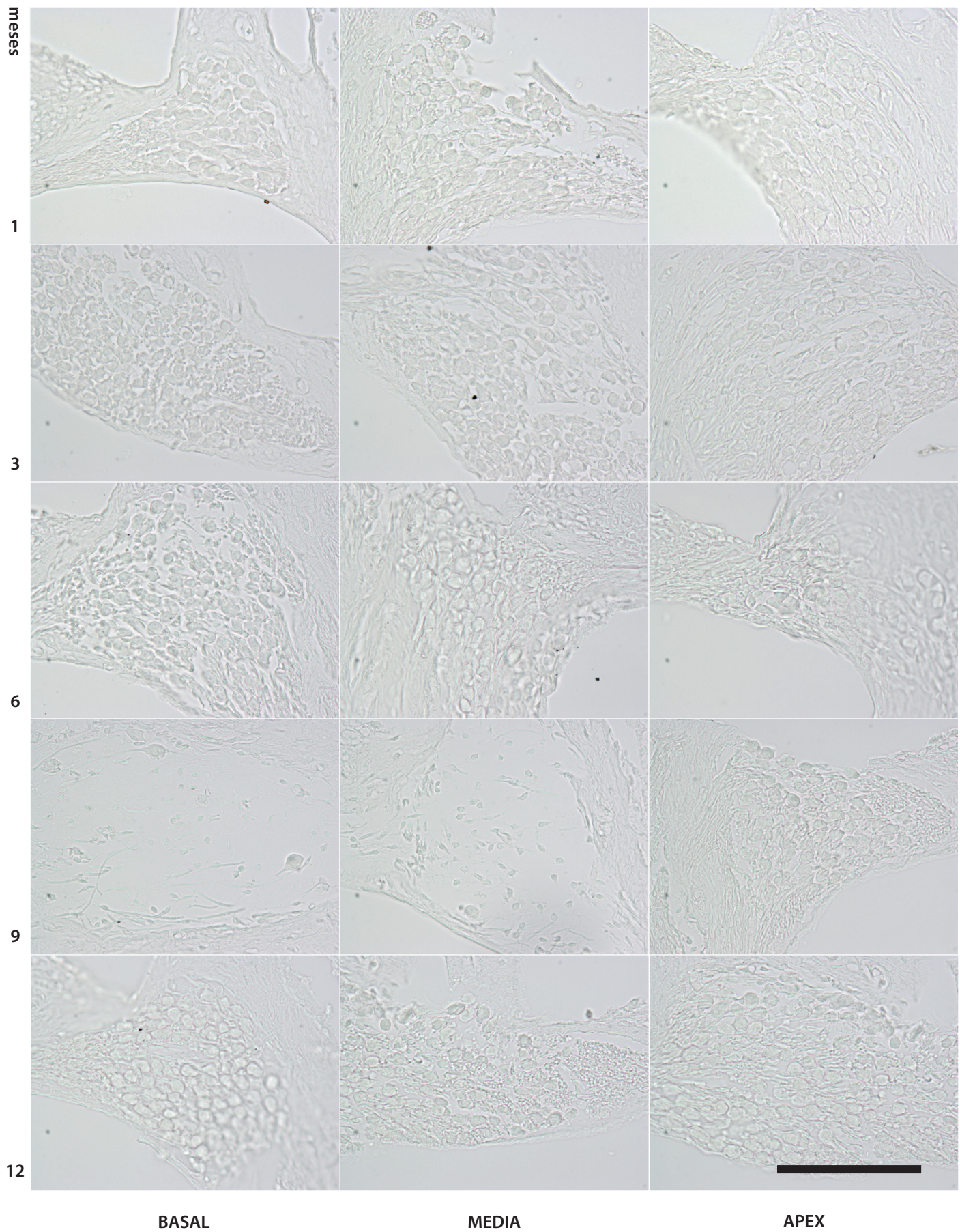
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Caspasa8: GRUPO HEMBRAS TRATADAS

Figura 52



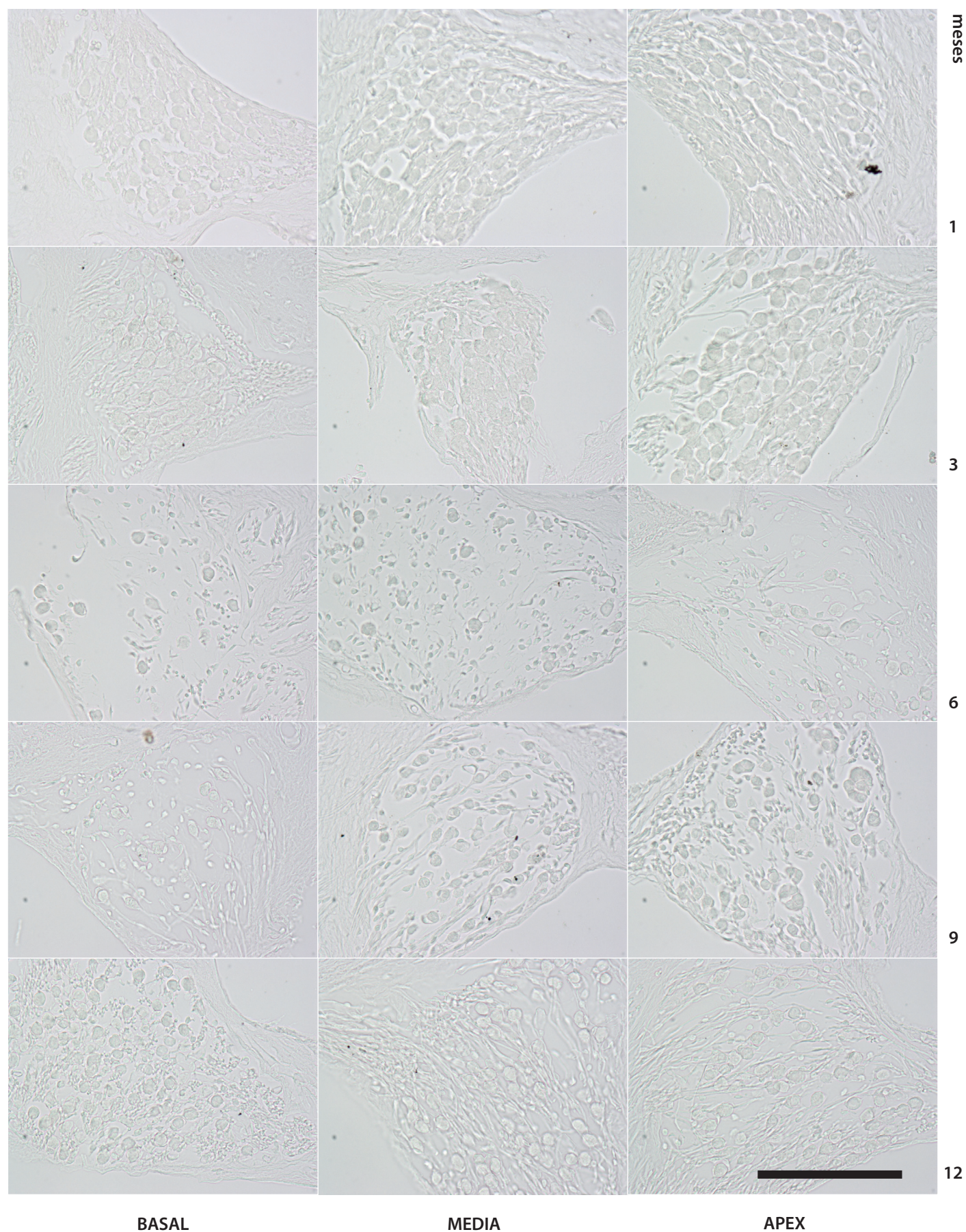
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Caspasa8: GRUPO MACHOS CONTROL

Figura 53



INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Caspasa8: GRUPO MACHOS TRATADOS

Figura 54



d) Detección inmunohistoquímica de BAX y de BCL-2:

BAX y Bcl-2 son dos marcadores que se utilizan habitualmente para valorar la tasa de células sanas y células apoptóticas en una población determinada. En este sentido, BAX es un marcador clásico de apoptosis por vía intrínseca, mientras que Bcl-2 es un marcador antiapoptótico típico de las células sanas (Nevado et al., 2006). Con la valoración conjunta de la expresión de ambos marcadores se podrá evaluar el grado de muerte celular frente al grado de supervivencia celular que existe en las muestras seleccionadas de cóclea de cada grupo. En el caso del presente estudio, como al tratarse de los mismos animales en cada grupo, se evaluará el marcaje con ambos anticuerpos BCL-2 y BAX de manera conjunta en las cócleas seleccionadas.

Así, en las preparaciones microscópicas se observa una clara relación entre el marcaje de los dos anticuerpos, de manera que en los animales muy positivos para BAX, no existe o hay muy poco marcaje para Bcl-2 y a la inversa, en muestras con mucho marcaje para Bcl-2, hay muy poco o no hay marcaje de BAX.

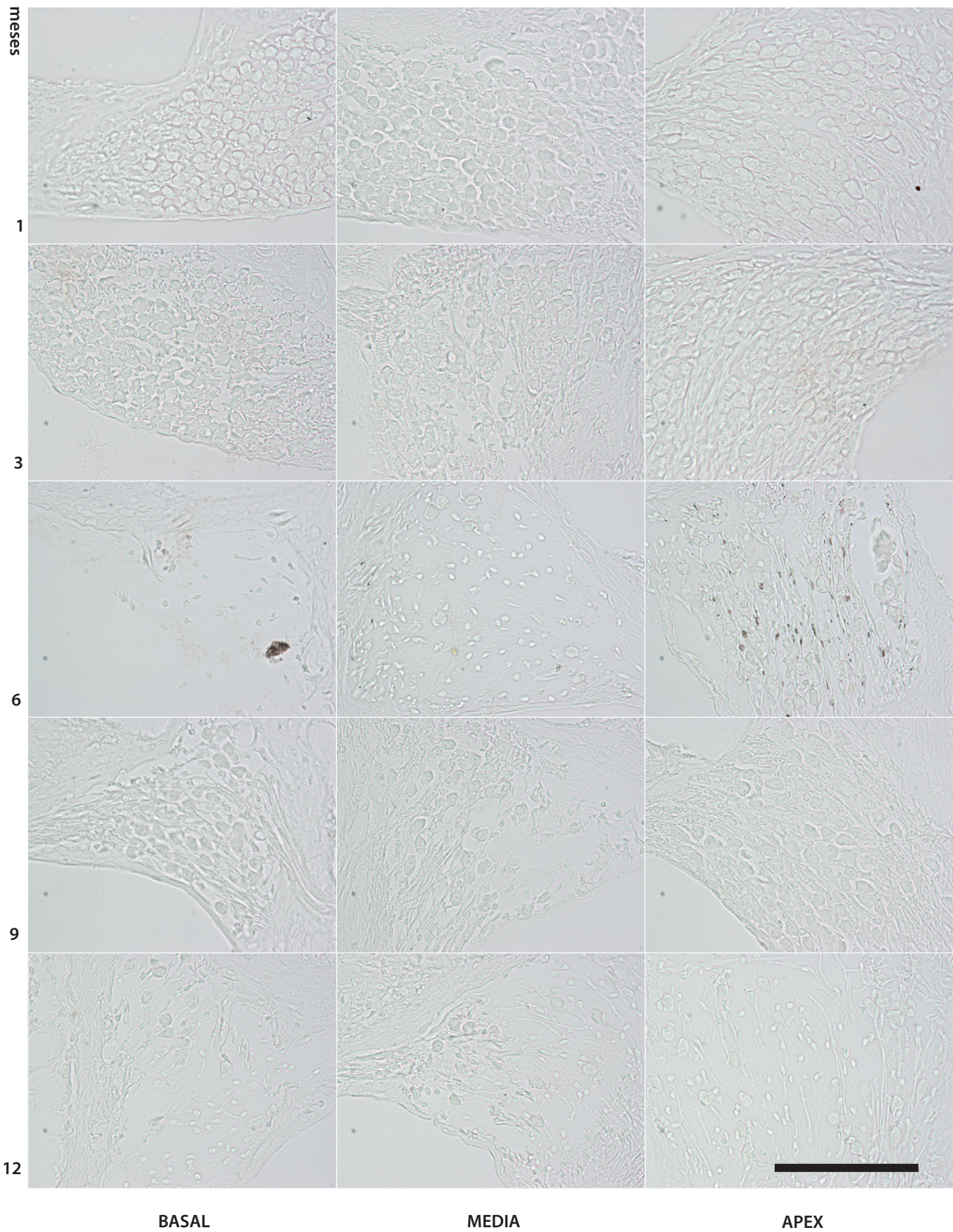
En el caso específico para el marcaje con anti-BAX, es positivo en todas las espiras y todas las edades, pero en pocas células en los animales control y más abundante en los individuos de menos edad. Hasta los 6 meses son positivos para BAX en todas las espiras y en los 9 y 12 meses solo se mantiene el marcaje en la espira basal. En el grupo de tratamiento es muy positivo a los 9 meses en las tres espiras del macho, mientras que en las hembras hay más marcaje en la ratona de 1 mes de edad. Por su parte, el marcaje para Bcl-2 es más positivo en el grupo de los machos, tanto tratados como controles y en concreto el animal de 1 mes con tratamiento de GMS presenta un marcaje fuertemente positivo en las tres espiras.

Figuras 55 a 58 (pág. posteriores): DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE BAX. Cuadros de microfotografías de cortes histológicos, en orientación midmodiolar, de 7 μm en parafina procedentes de cócleas de ratón C57BL6J en sección midmodiolar. Las imágenes, tomadas a gran aumento, se corresponden con los ganglios espirales de las espiras basal, medial y apical, de los grupos de hembras y machos y de tratamiento, de 1, 3, 6, 9 y 12 meses de edad. Barra de escala: 100 μm .

Figuras 59 a 62 (pág. posteriores): DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE Bcl-2. Cuadros de microfotografías de cortes histológicos, en orientación midmodiolar, de 7 μm en parafina procedentes de cócleas de ratón C57BL6J en sección midmodiolar. Las imágenes, tomadas a gran aumento, se corresponden con los ganglios espirales de las espiras basal, medial y apical, de los grupos de hembras y machos y de tratamiento, de 1, 3, 6, 9 y 12 meses de edad. Barra de escala: 100 μm .

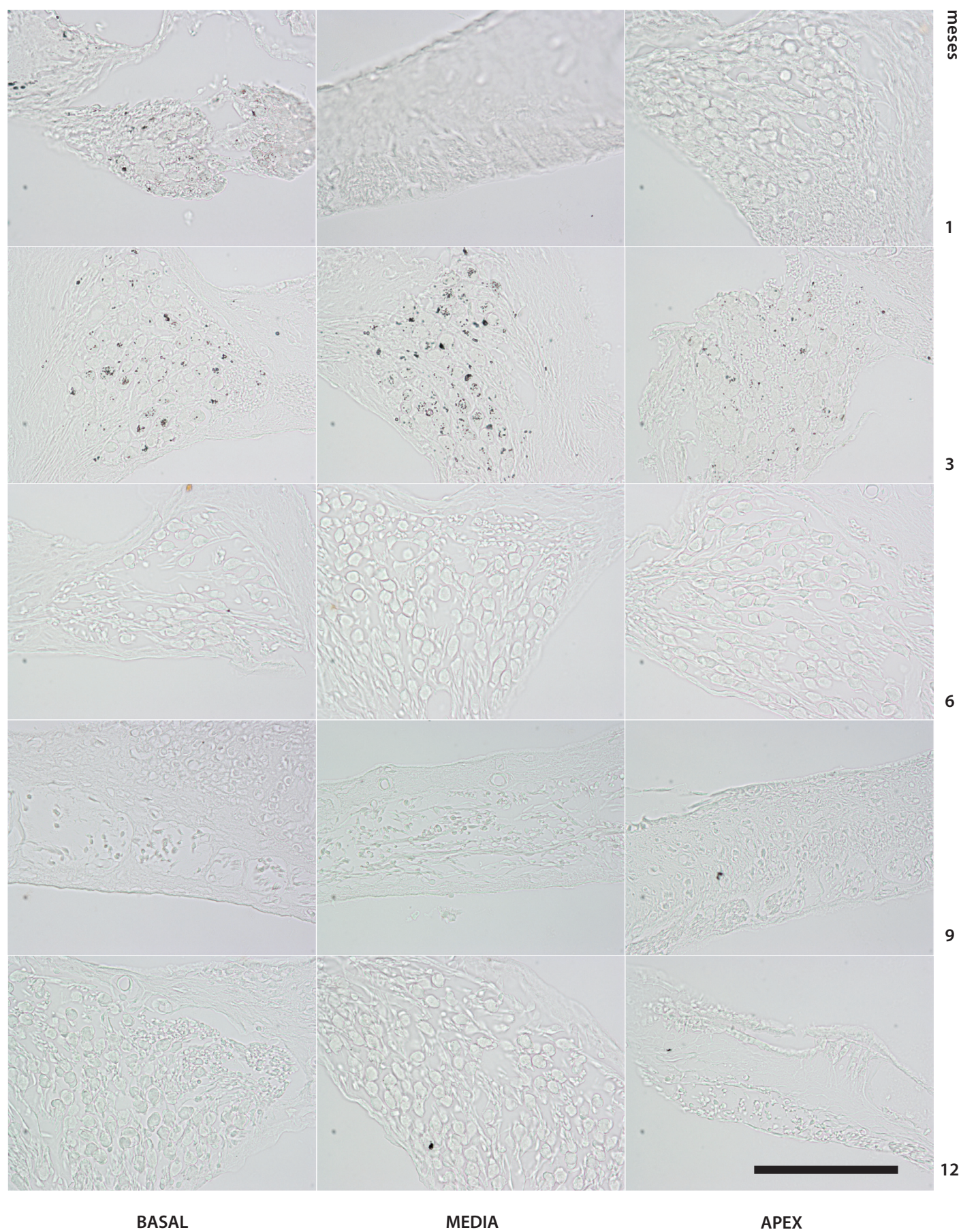
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-BAX: GRUPO HEMBRAS CONTROL

Figura 55



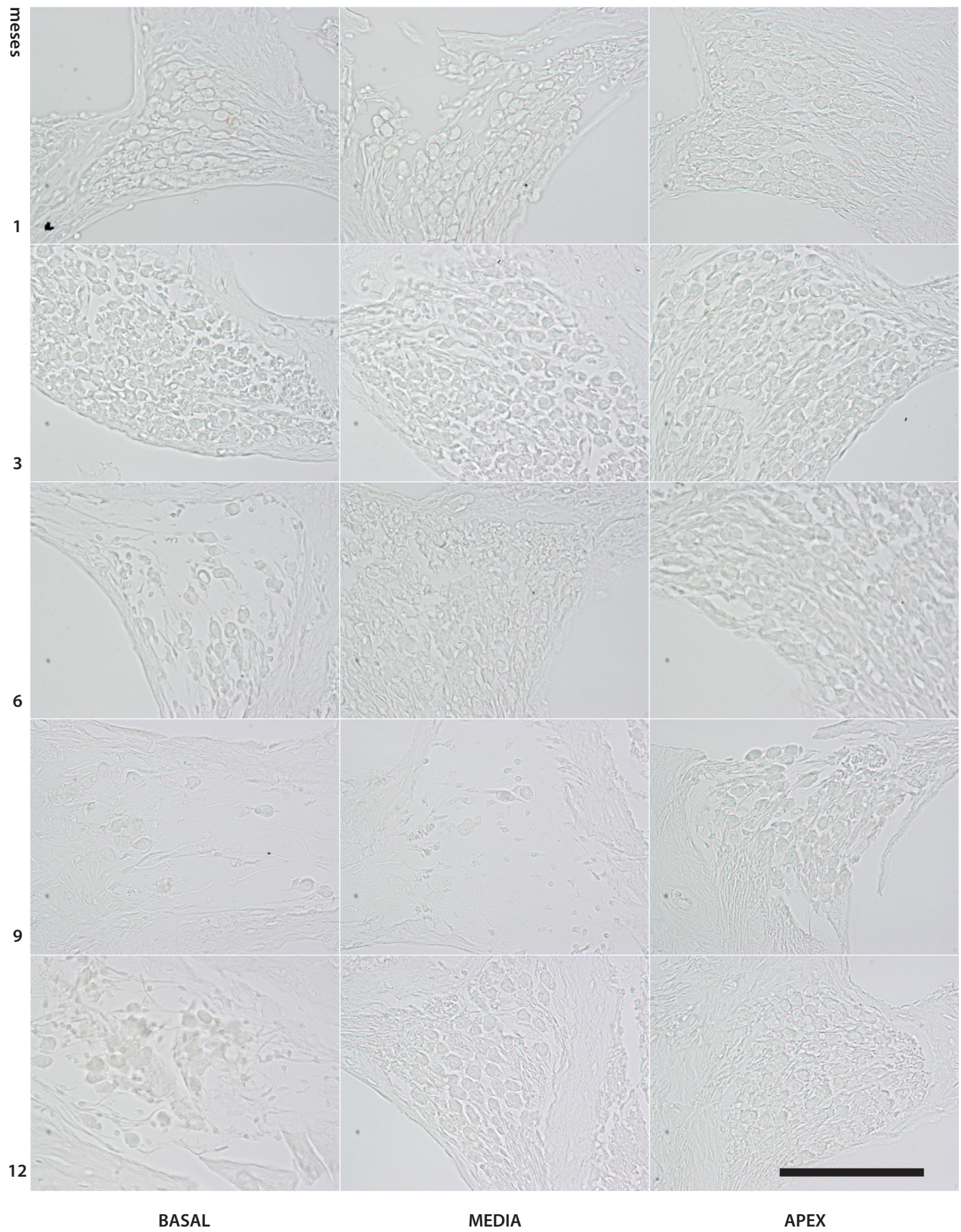
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-BAX: GRUPO HEMBRAS TRATADAS

Figura 56



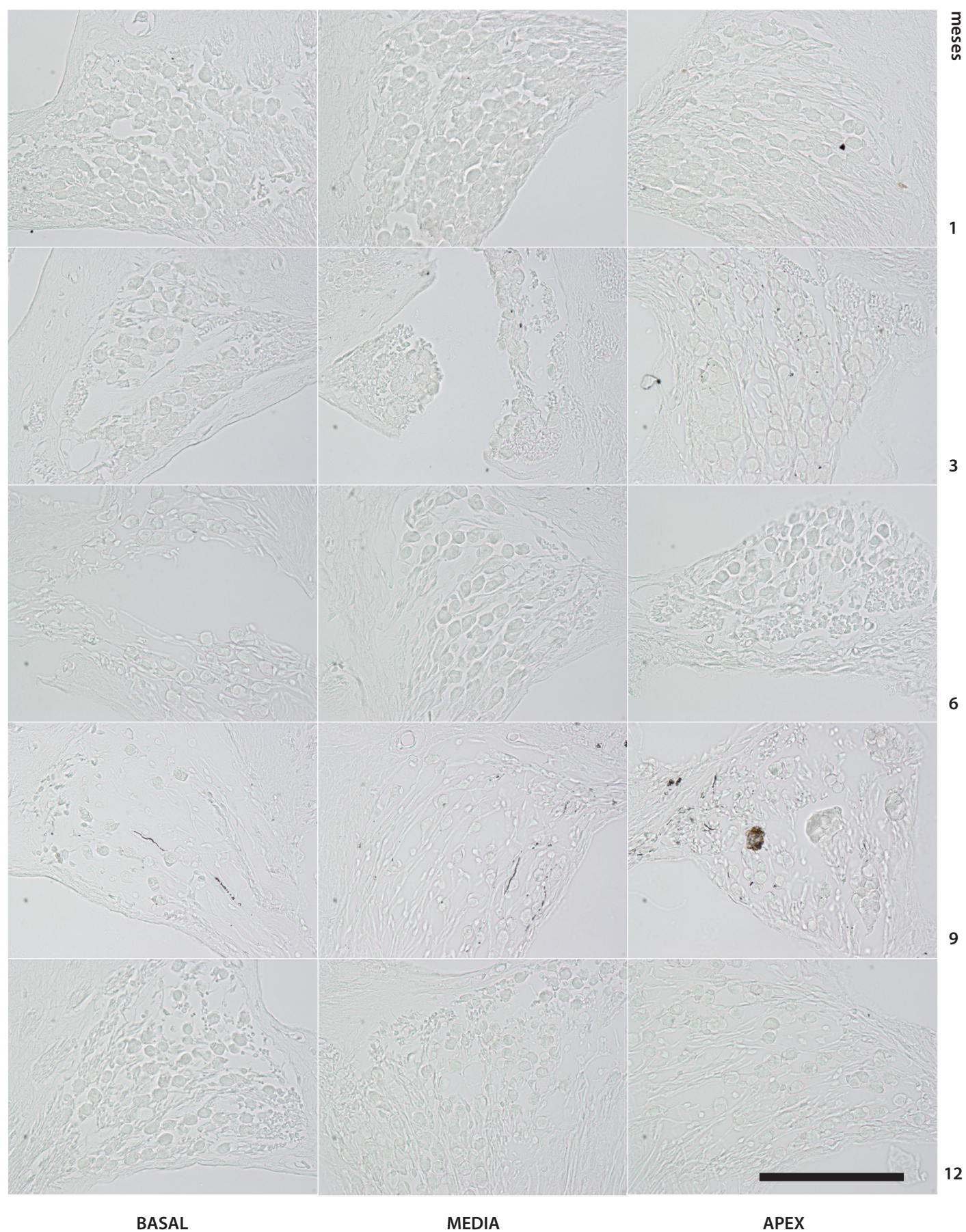
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-BAX: GRUPO MACHOS CONTROL

Figura 571



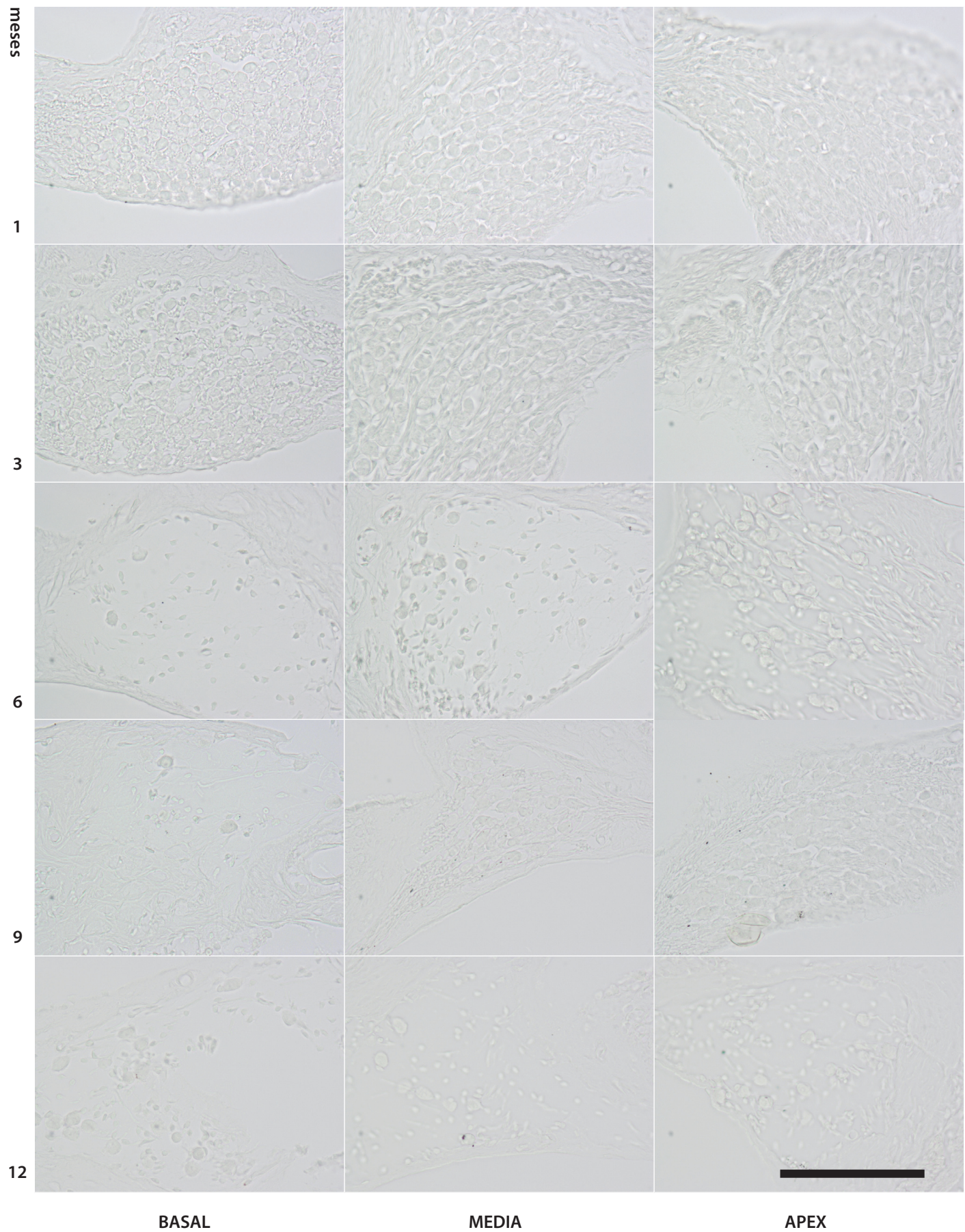
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-BAX: GRUPO MACHOS TRATADOS

Figura 58



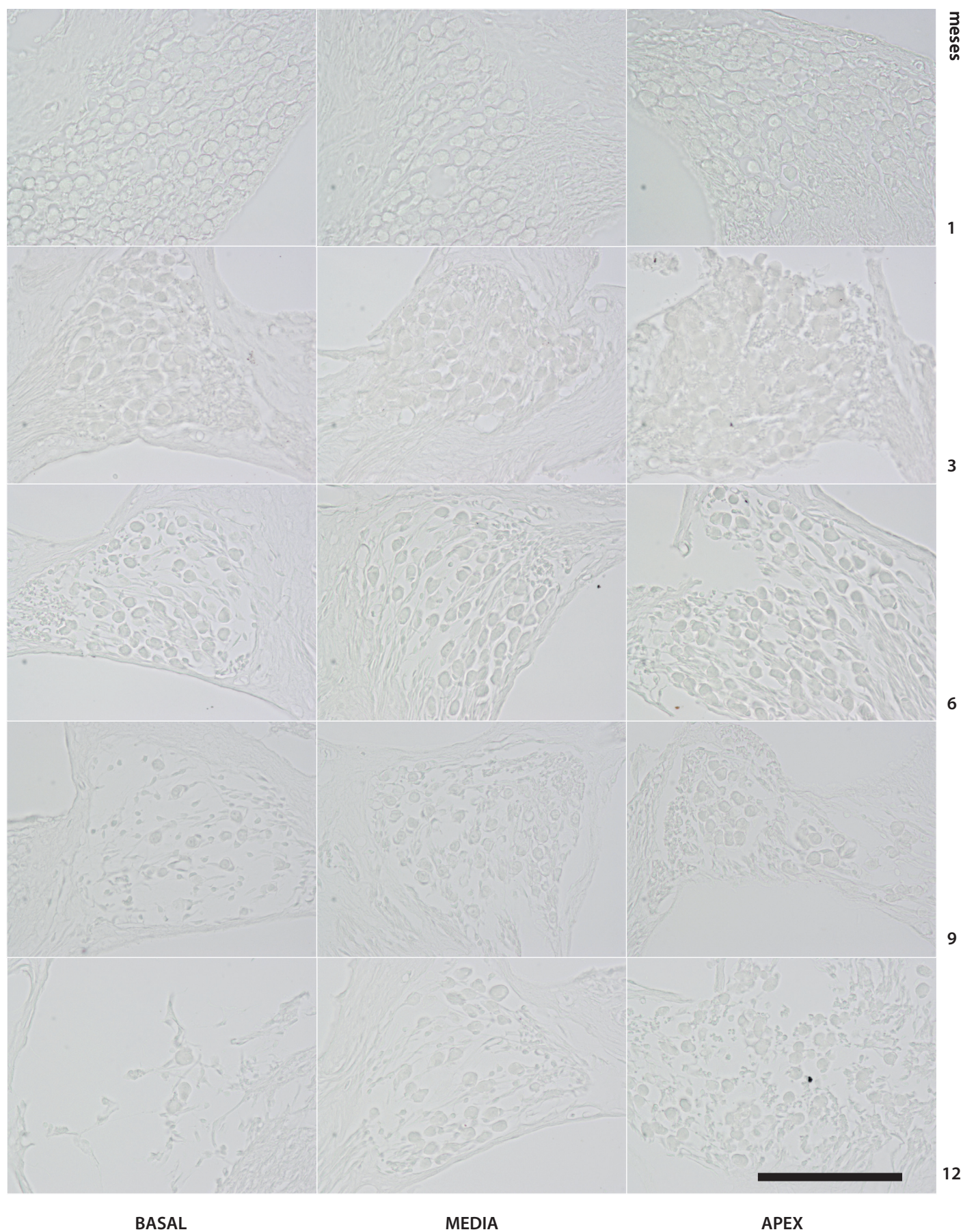
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Bcl-2: GRUPO HEMBRAS CONTROL

Figura 59



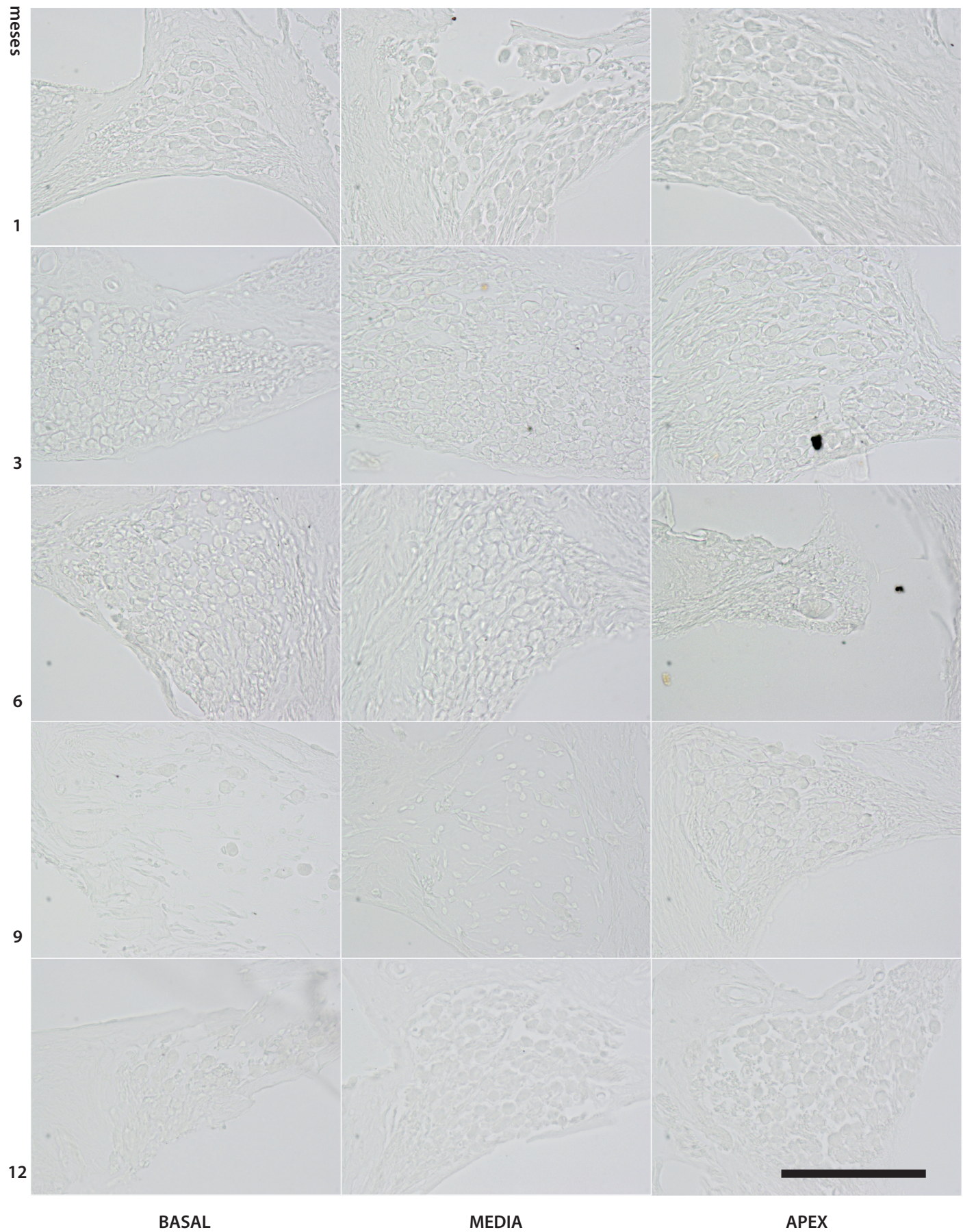
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Bcl-2: GRUPO HEMBRAS TRATADAS

Figura 60



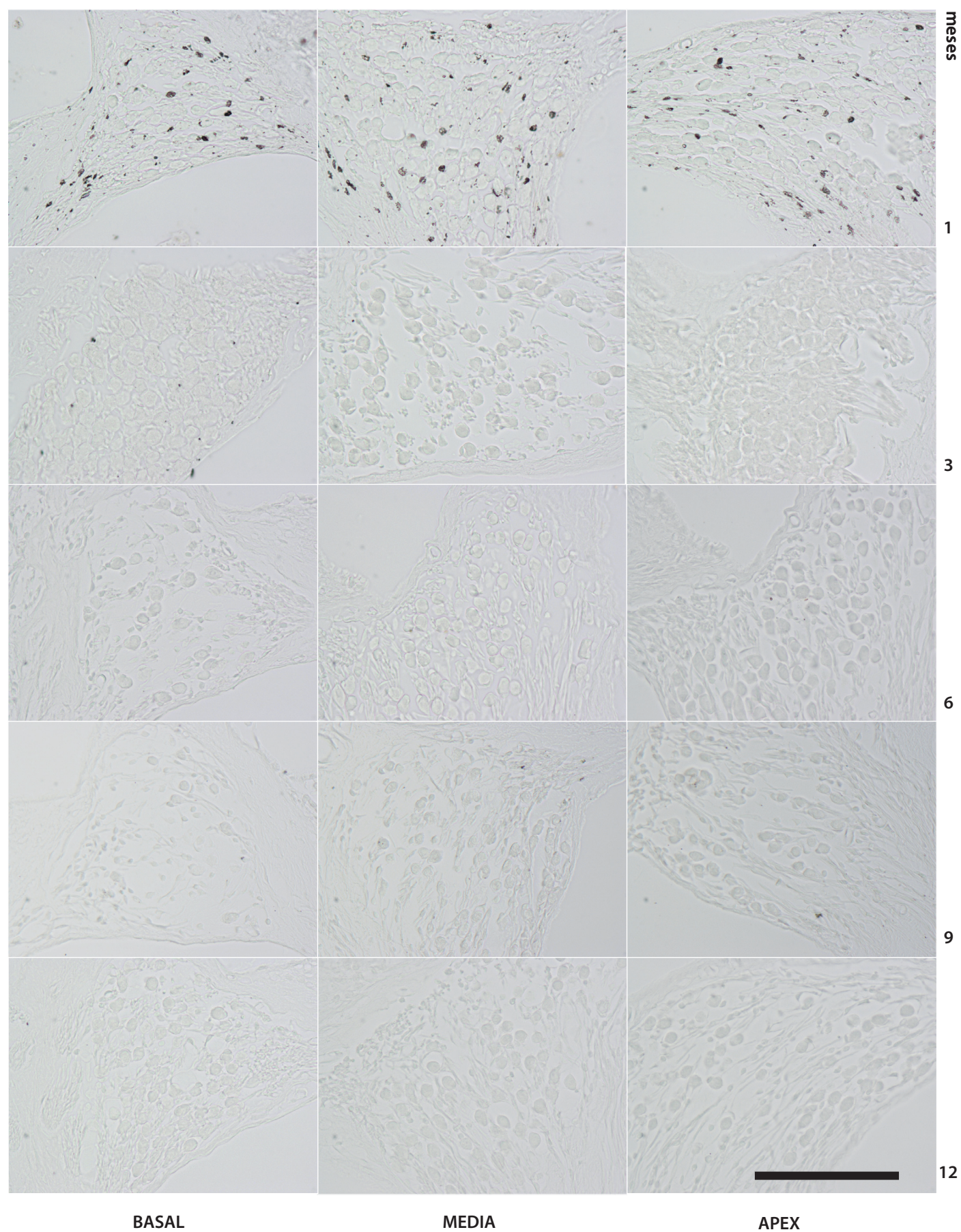
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Bcl-2: GRUPO MACHOS CONTROL

Figura 61



INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-Bcl-2: GRUPO MACHOS TRATADOS

Figura 62



e) Detección inmunohistoquímica de Enolasa neuronal específica (NSE):

La enolasa (o fosfopiruvato hidratasa) es una metaloenzima que cataliza la transformación de 2- fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato durante la glucólisis y está presente en todos los tejidos del organismo. La isoenzima de enolasa específica para el sistema nervioso se conoce como Enolasa 2 o enolasa neuronal específica (NSE), y se ha empleado fundamentalmente como marcador de neurogénesis en el sistema nervioso central y periférico, encontrándose también en las neuronas tipo I del ganglio espiral coclear como señalizador de una buena actividad metabólica neuronal ([Szabó et al, 2002](#); [Anniko et al, 1995](#)).

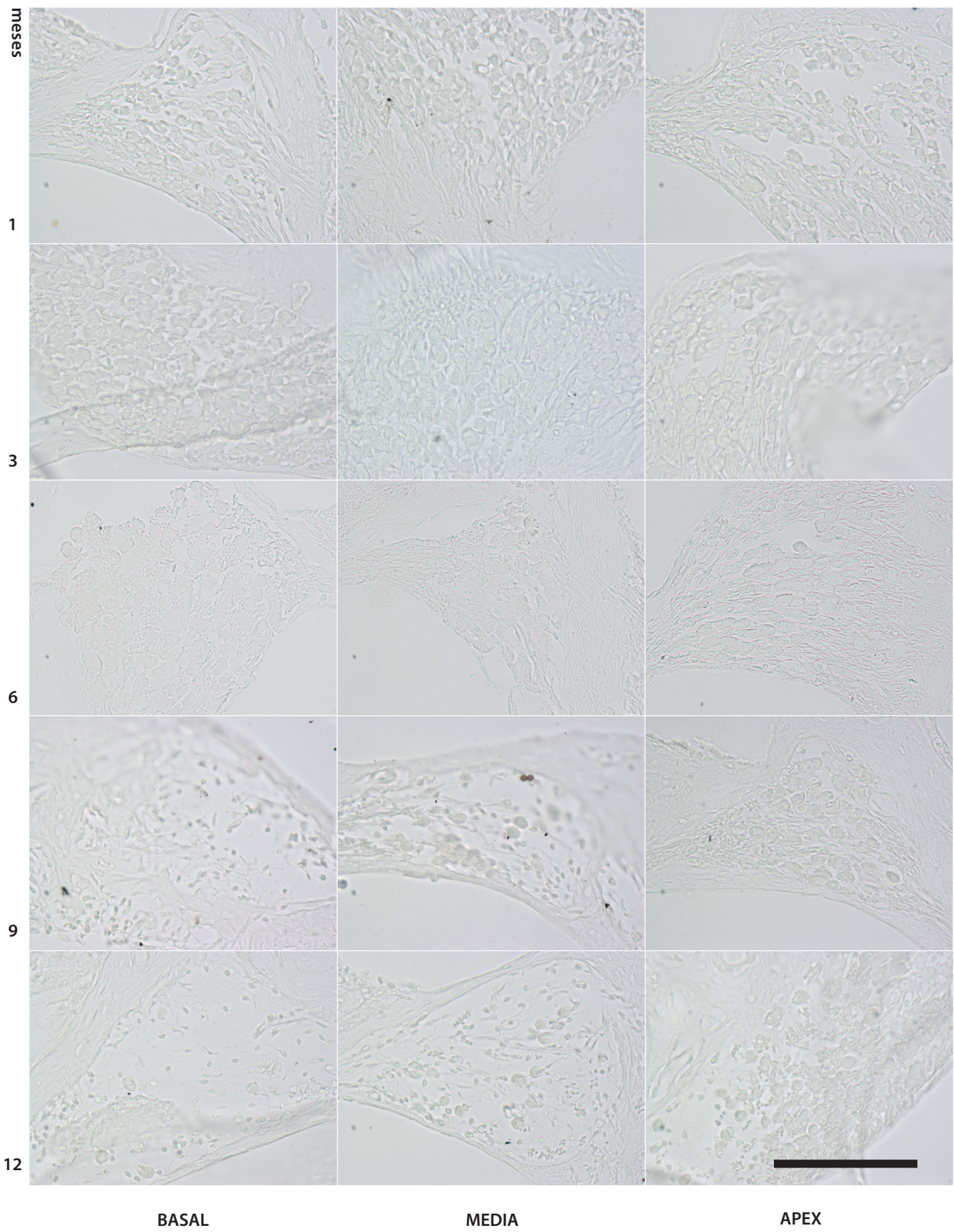
En los presentes resultados, parece haber pocos positivos detectados por la anti-enolasa en general, pero hay más positivos en los ganglios espirales de animales tratados con GMS y es cualitativamente mayor el marcaje en la espira apical, sobre todo a los 3 meses, tanto en el grupo de machos como en hembras sometidas al tratamiento. Por el contrario, la espira basal de los machos tratados es la que presenta menor cantidad de marcaje desde los 3 a los 6 meses. Las hembras tratadas parecen marcadas homogéneamente, aunque el marcaje sea menos positivo en general.

Por su parte, el grupo control tiene poco marcaje, pero homogéneo también en las espiras basales y mediales. La espira basal solo es positiva para NSE en los machos controles a los 12 meses, mientras que en las hembras el marcaje más positivo se da en las de 6 y 9 meses y es más frecuente que en los machos controles sobre todo en la espira basal y media.

Figura 63 a 66 (pág siguientes): INMUNOHISTOQUÍMICA DE ENOLASA NEURONAL ESPECÍFICA (NSE). Cuadros de microfotografías de cortes histológicos, en orientación midmodiolar, de 7 μm en parafina procedentes de cócleas de ratón C57BL6J en sección midmodiolar. Las imágenes, tomadas a gran aumento, se corresponden con los ganglios espirales de las espiras basal, medial y apical, de los grupos de hembras y machos y de tratamiento, de 1, 3, 6, 9 y 12 meses de edad. Barra de escala: 100 μm .

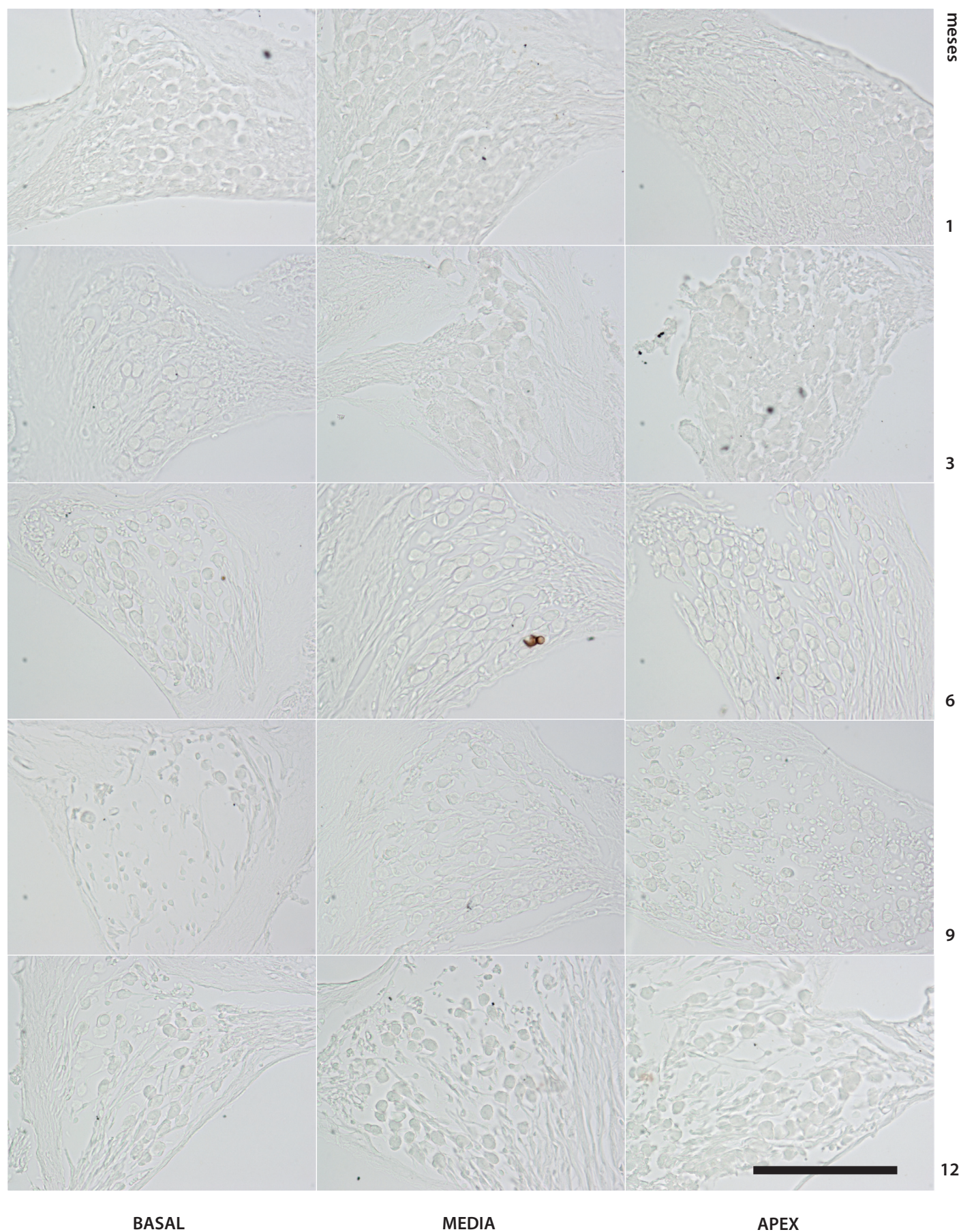
INMUNOHISTOQUÍMICA NSE: GRUPO HEMBRAS CONTROL

Figura 63



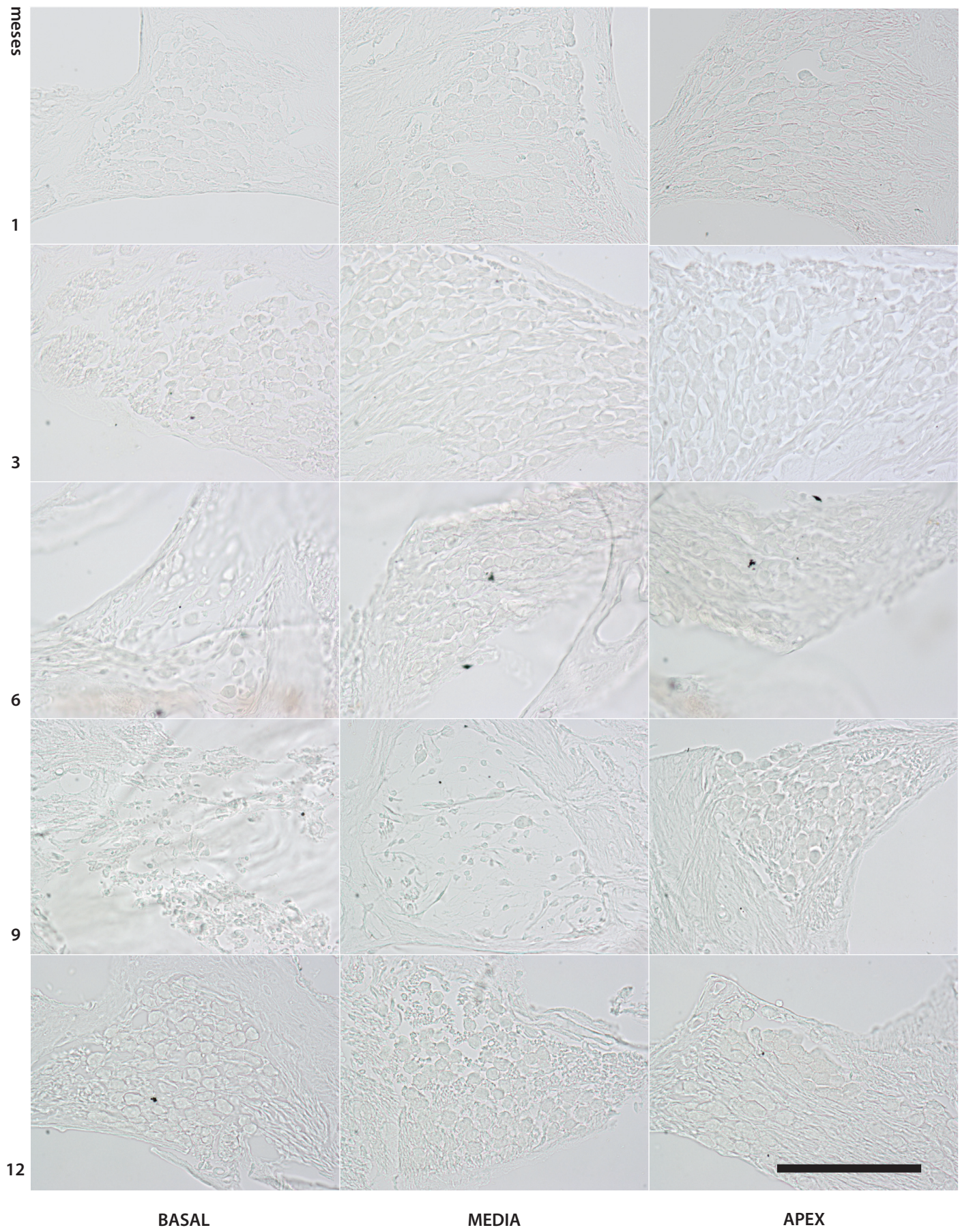
INMUNOHISTOQUÍMICA NSE: GRUPO HEMBRAS TRATADAS

Figura 64



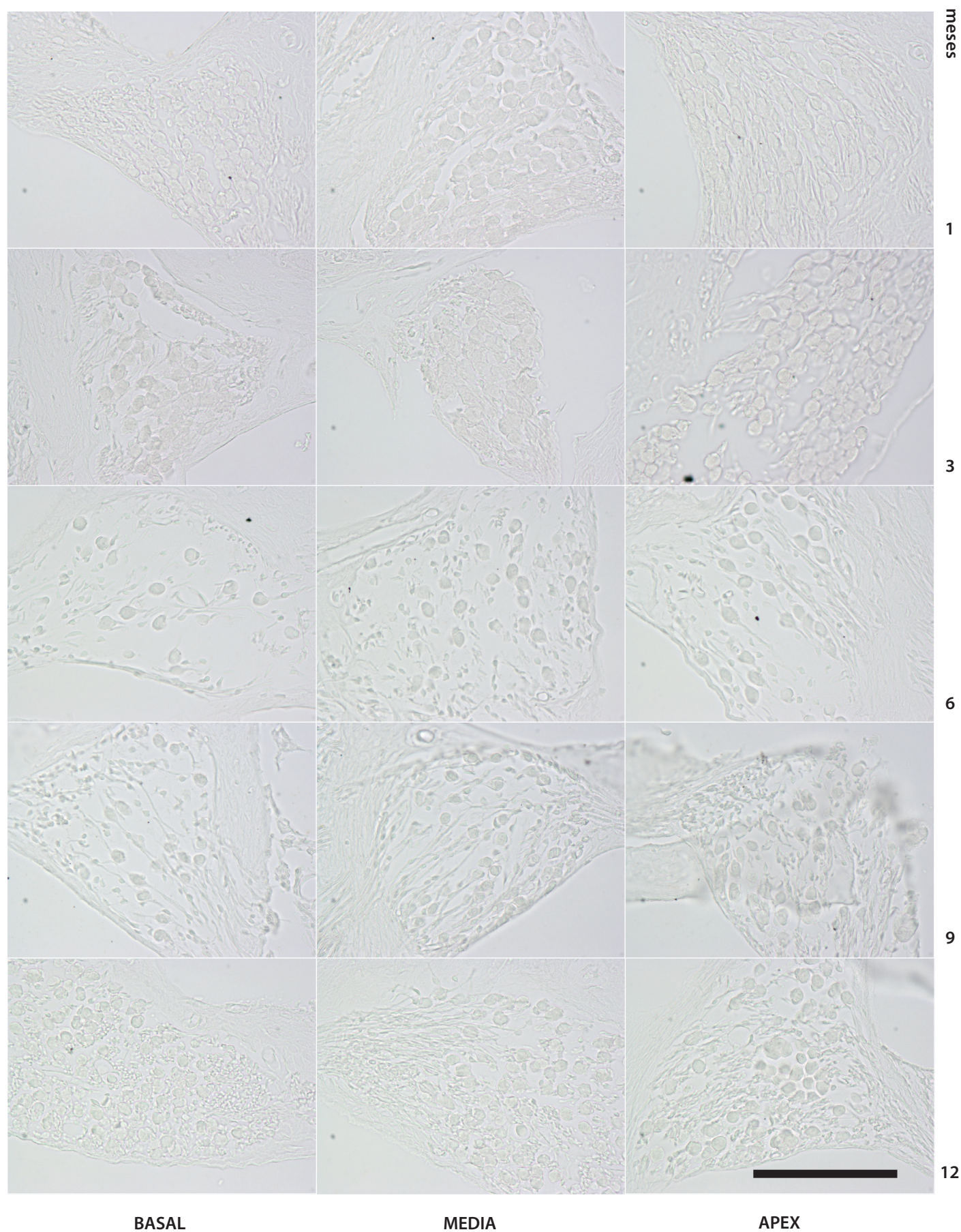
INMUNOHISTOQUÍMICA NSE: GRUPO MACHOS CONTROL

Figura 65



INMUNOHISTOQUÍMICA NSE: GRUPO MACHOS TRATADOS

Figura 66



f) Detección inmunohistoquímica de neurofilamentos 200kda:

Este anticuerpo marca específicamente los neurofilamentos de las neuronas tipo II del ganglio espiral y se ha utilizado para poner de manifiesto su presencia en las muestras histológicas de cóclea ([Berglund et al 1986](#)).

En los animales control prácticamente no se observa marcaje de las fibras ni de los somas de las neuronas tipo II, mientras que en el caso de los animales tratados con GMS existe un marcaje muy evidente sobretodo de las fibras de estas neuronas, tanto del axón neuronal como de las dendritas. En algunos casos aparecen algunos somas neuronales marcados también.

En el caso de los grupos controles el marcaje es más intenso en los machos, sobretodo de 3 y 6 meses de edad y en mayor medida en la espira apical y medial. Sin embargo, en las hembras control no existen casi neuronas marcadas y los positivos son homogéneos para todas las espiras y edades, salvo a los 12 meses, en los que el marcaje es muy evidente.

Tanto las hembras como los machos tratados con GMS parecen tener un marcaje muy positivo en todas las espiras y a todas las edades. En el caso del grupo de machos tratados parecen disminuir los positivos en el animal de 1 mes y 12 meses en todas las espiras.

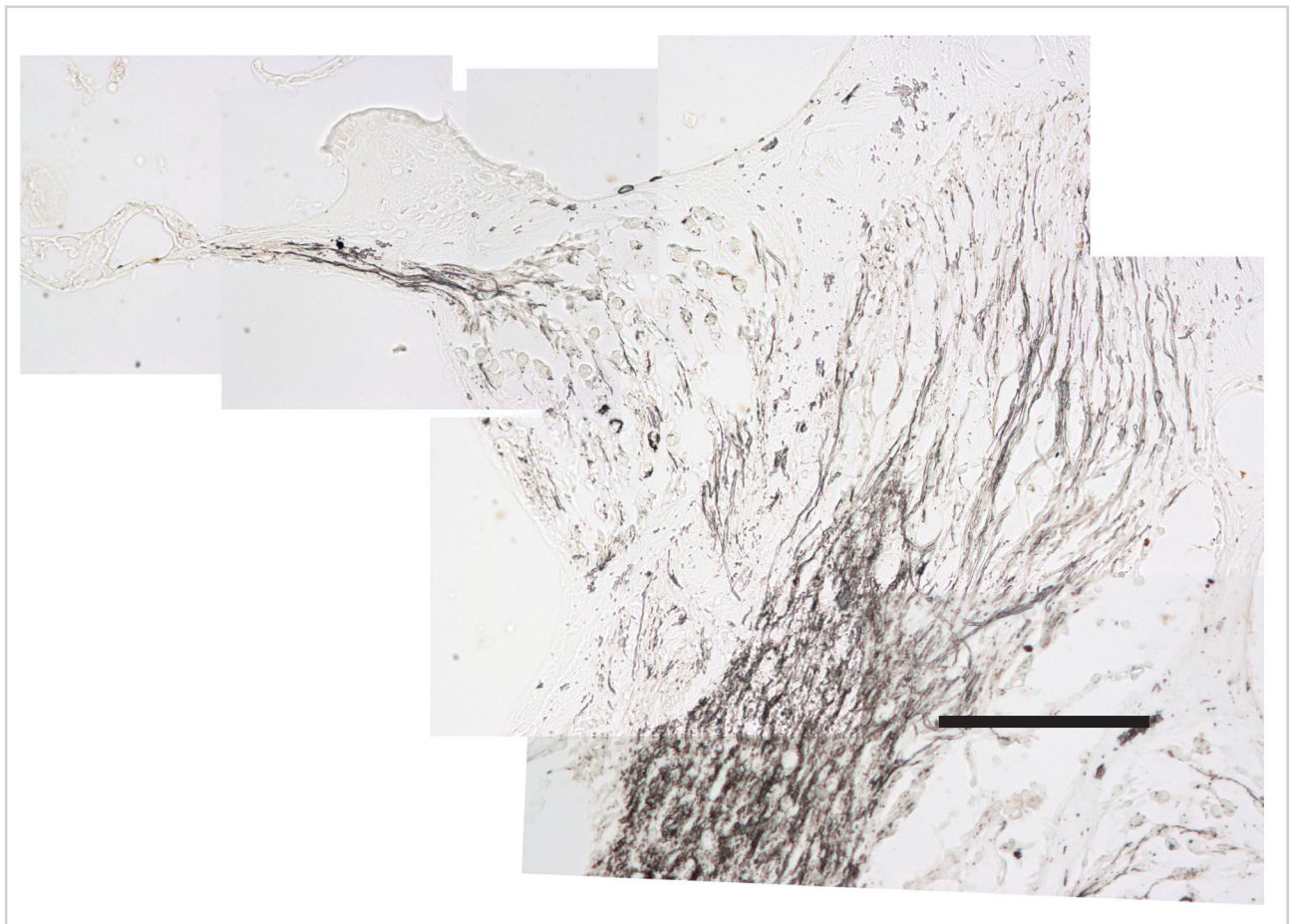
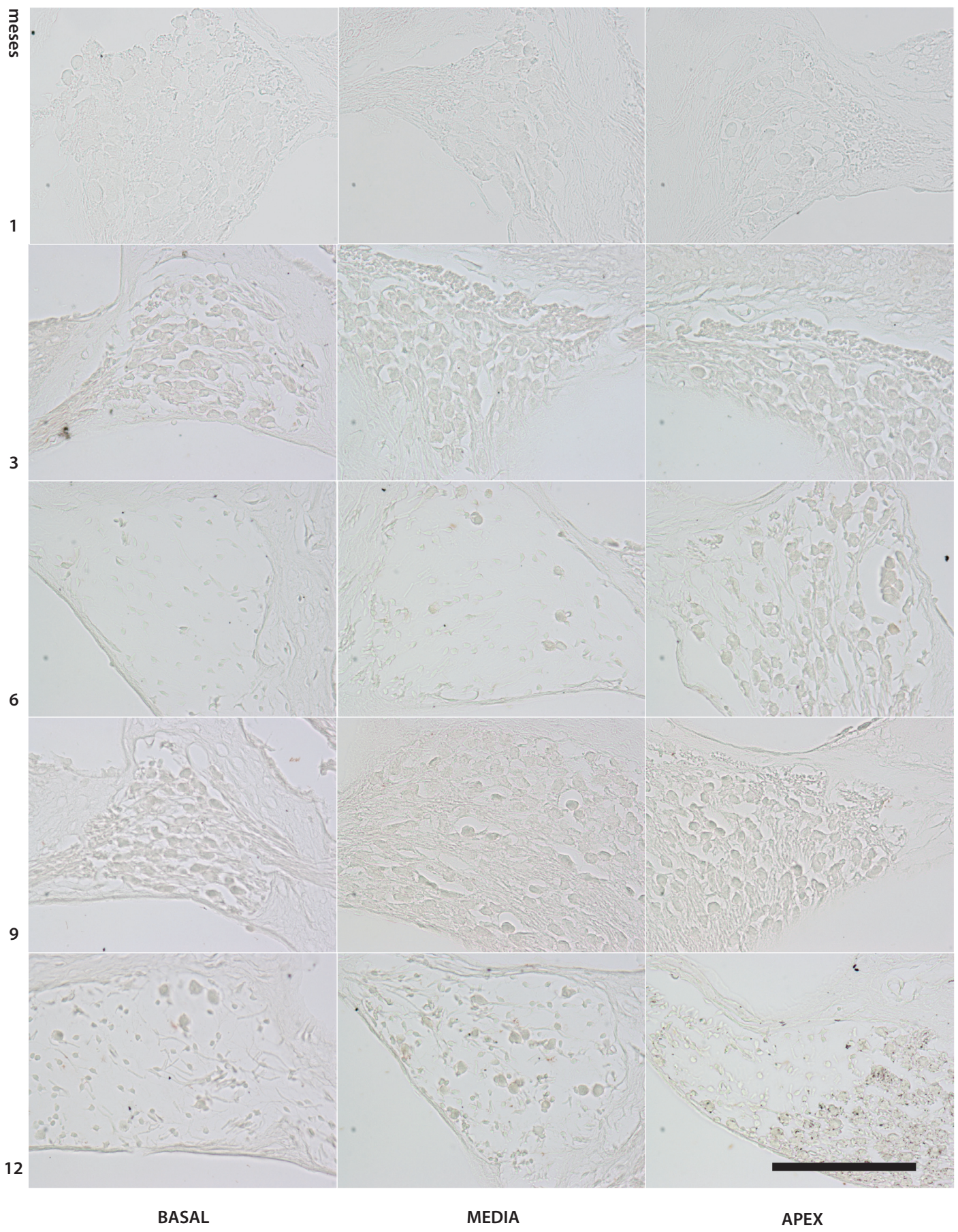


Figura 67: Detección Inmunohistoquímica de NF-200kDa. Montaje microfotográfico del receptor auditivo de un macho de 9 meses de edad, tratado con GMS. Se observa marcaje positivo para NF-200 kDa en las dendritas de las neuronas tipo II en el órgano de Corti, bajo las células ciliadas externas y su paso por el túnel de Corti y el canal de Rosenthal hasta llegar al ganglio espiral, en donde se sitúan algunos somas de este tipo neuronal marcados para posteriormente, localizar los positivos también en los axones que discurren por el interior del modiollo hasta formar parte del nervio auditivo, el VIII par craneal. Barra de escala: 100 μ m.

Figura 68 a 71 (pág posteriores): Inmunohistoquímica de neurofilamentos 200kDa. Cuadros de microfotografías de cortes histológicos, en orientación midmodiolar, de 7 μ m en parafina procedentes de cócleas de ratón C57BL6J en sección midmodiolar. Las imágenes, tomadas a gran aumento, se corresponden con los ganglios espirales de las espiras basal, medial y apical, de los grupos de hembras y machos y de tratamiento, de 1, 3, 6, 9 y 12 meses de edad. Barra de escala: 100 μ m.

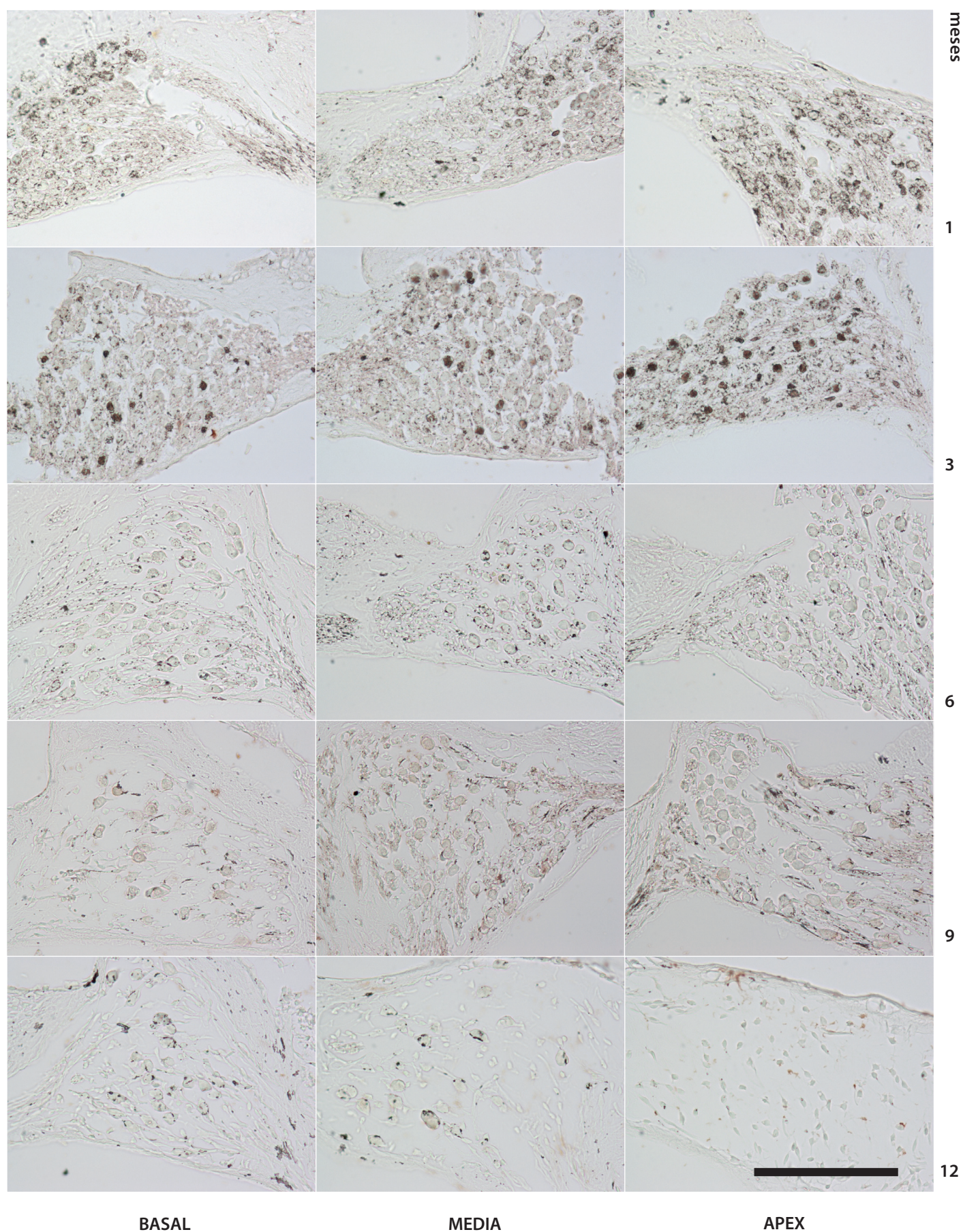
INMUNOHISTOQUÍMICA Neurofilamentos 200kDa: GRUPO HEMBRAS CONTROL

Figura 68



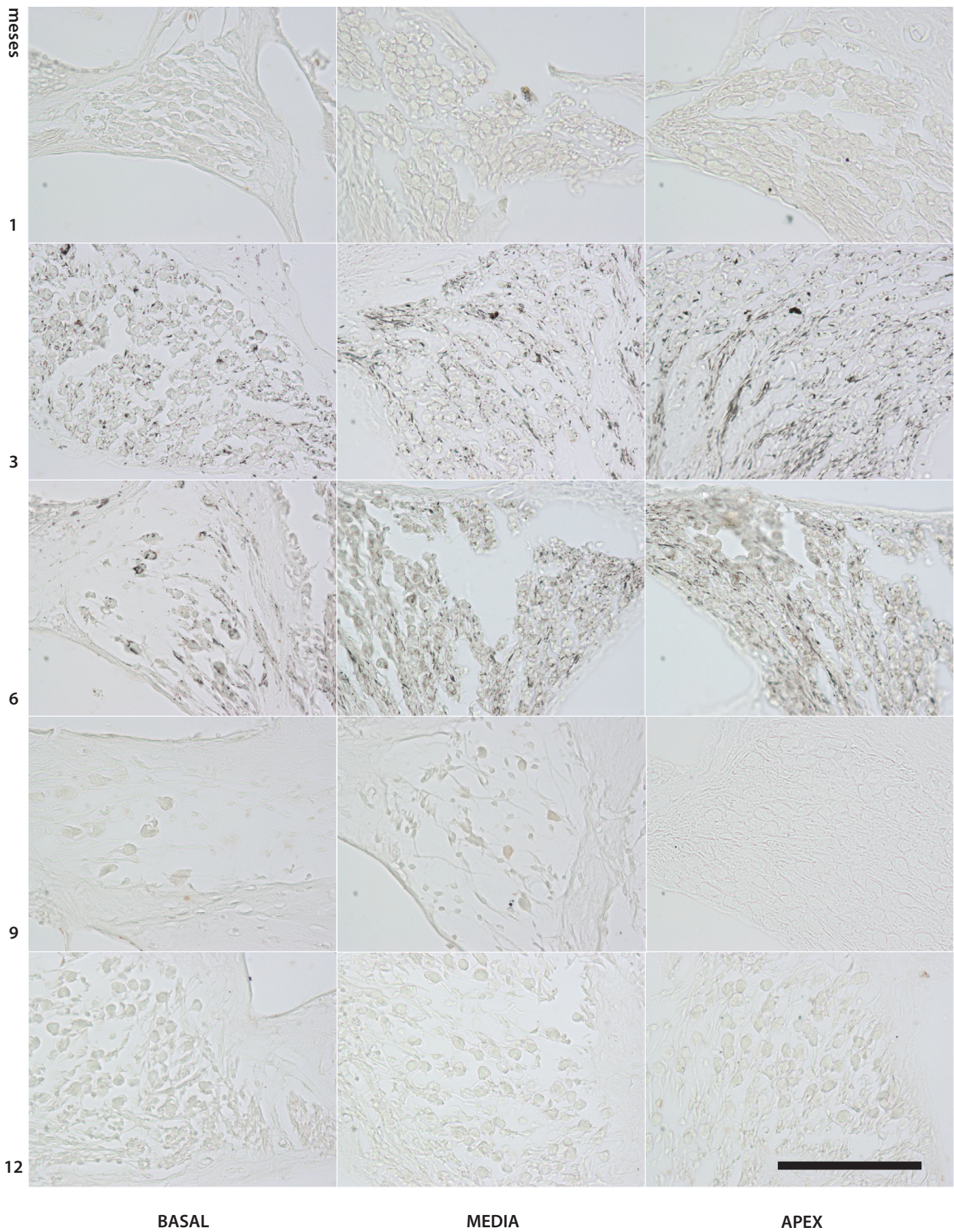
INMUNOHISTOQUÍMICA Neurofilamentos 200kDa: GRUPO HEMBRAS TRATADAS

Figura 69



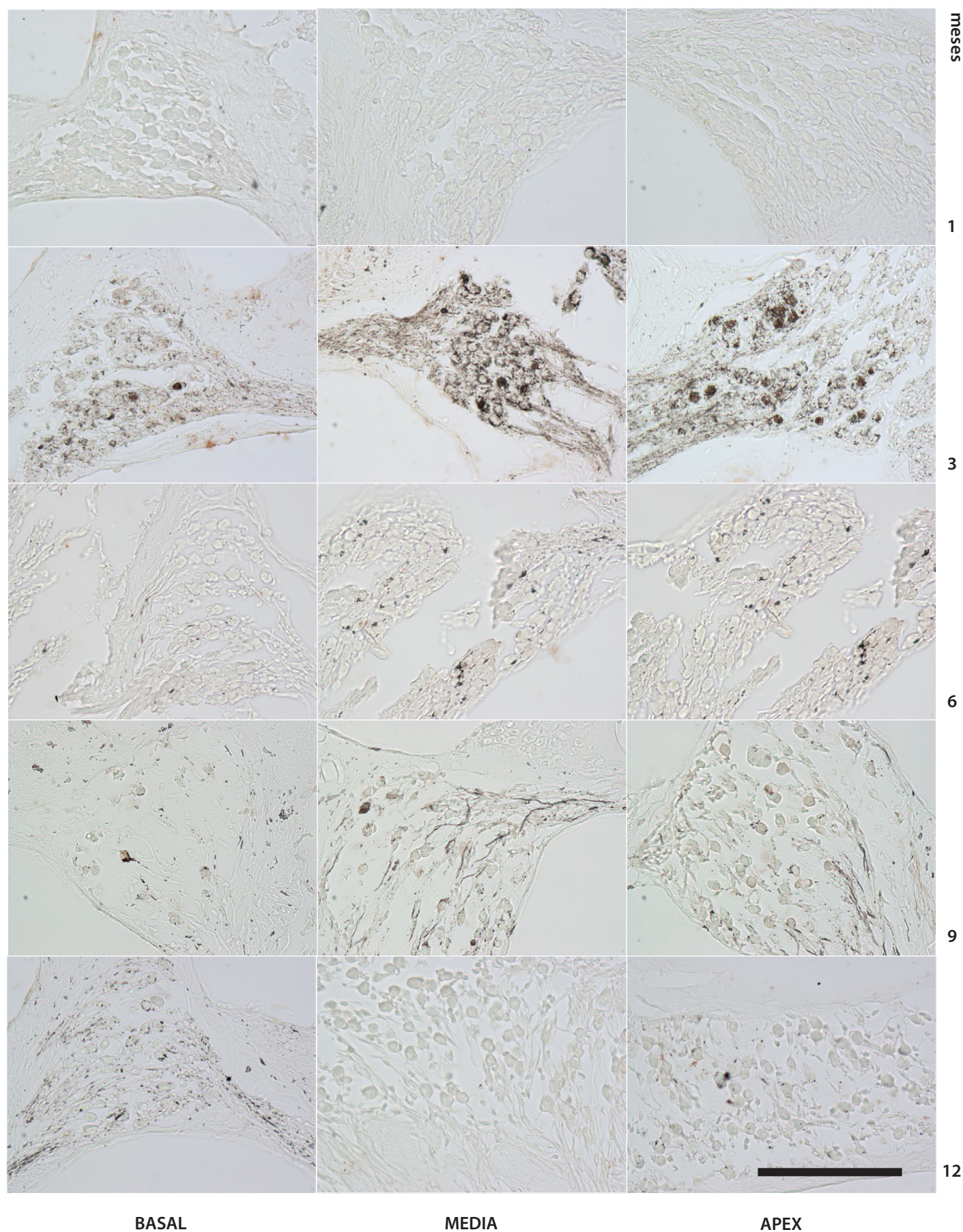
INMUNOHISTOQUÍMICA Neurofilamentos 200kDa: GRUPO MACHOS CONTROL

Figura 70



INMUNOHISTOQUÍMICA Neurofilamentos 200kDa: GRUPO MACHOS TRATADOS

Figura 71



Discusión

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral confirman la sensibilidad diferencial de los distintos grupos experimentales a la neurotoxicidad inducida por la administración de GMS. Así, tanto los resultados electrofisiológicos como los morfológicos presentan datos que confirman la hipótesis.

5.1. ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO. REGISTRO DE EVOCADOS AUDITIVOS DE TRONCO CEREBRAL

El PEATC representa la mejor opción para la cuantificación objetiva de la audición ya que de sus cinco ondas se puede obtener información que representa la actividad de la parte de la vía auditiva situada en el tronco cerebral. Así, la amplitud de sus ondas indicaría indirectamente la cantidad de neuronas que, tras la estimulación sonora, se activan sincrónicamente mientras que la latencia de aparición de las ondas informaría sobre la eficacia de la transmisión neural en la vía auditiva ([Gil-Loyzaga y Carricondo, 2013](#)).

El ratón C57BL/6 es el modelo experimental más utilizado en estudios de presbiacusia, ya que presenta un envejecimiento neurosensorial muy precoz con una sordera progresiva, hacia finales del primer año de vida, de características similares a la presbiacusia humana ([Bartolomé et al., 2009](#); [Park et al., 2010](#)). En estudios previos de nuestro laboratorio ([Maestre, 2002](#); [Bartolomé et al., 2002](#); [Castillo et al., 2006](#)) se ha observado que, a partir de los nueve meses, estos ratones comienzan a padecer una hipoacusia neurosensorial que exhibe una caída notable de amplitud del PEATC ([Bartolomé et al., 2002](#); [Castillo et al., 2006](#)). Este hecho correlaciona bien con datos morfológicos previos, en los que la degeneración del órgano de Corti queda patente a partir de los 9 meses de edad, comenzando por las CCEs, seguida por las CCI y la consecuente pérdida neuronal en el ganglio espiral ([Maestre, 2002](#); [Bartolomé et al., 2002](#); [Castillo et al., 2006](#); [Bartolomé et al., 2009](#)).

5.1.1. Estudio del efecto de la edad

En las tres ondas del PEATC analizadas a 70, 80, 90 y 100 dB(SPL) (Fig. 16), la variabilidad de la muestra debida al efecto de la edad fue muy significativa entre los 5 grupos de 1, 3, 6, 9 y

12 meses. De esta manera, las características de los PEATC van a sufrir variaciones a medida que los animales van envejeciendo siendo estas variaciones significativas entre los grupos de edad. Este resultado se corresponde con los de otros estudios en los que, la sordera asociada al envejecimiento, en ratones C57 envejecidos, se asocia con un aumento de los umbrales y con una tendencia al aumento de las latencias con la edad, mientras que las amplitudes de las ondas I, II y III de los PEATC, disminuyen significativamente en el envejecimiento de los ratones C57 (Hunter y Willott, 1987), indicando un claro desarrollo de la pérdida auditiva asociada a la edad en esta cepa de ratón (Xue et al., 2016).

Mientras que los animales de 1, 3 y 6 meses presentaron resultados similares en los PEATC, se ha observado que a los 9 y 12 meses de edad los valores de latencia de las ondas son mayores y los de amplitud menores para todos los grupos. No se observaron en este caso, diferencias significativas entre sexos, al igual que otros estudios corroboran este resultado, sin encontrar diferencias sexuales a esta edad en ninguna cepa estudiada (Hunter y Willott, 1987).

Los animales a partir de 9 meses, tanto hembras como machos, parecen tener peor rango audiométrico, latencias más altas y amplitudes más bajas debido posiblemente a la pérdida de neuronas y degradación del receptor auditivo que se produce a lo largo del envejecimiento y durante la presbiacusia, mientras que los grupos de animales comprendidos entre 1 y 6 meses presentan latencias y amplitud similares, lo que podría demostrar que el efecto del envejecimiento en el receptor auditivo comienza a los 9 meses en ambos grupos (Castillo et al., 2006). Sin embargo, otros estudios han mostrado que este proceso de envejecimiento en las cepas de ratones C57, se da ya a partir de los 3 meses de edad, existiendo una degeneración muy precoz, predominantemente de CCEs, acompañado de un inicio de la degeneración de las células del ganglio espiral coclear basal y de la estría vascular, iniciada por procesos apoptóticos (Park et al., 2010).

También hay que tener en cuenta a la innervación eferente coclear y su papel. Así, los cambios relacionados con la edad podrían indicar que la innervación dopaminérgica coclear se ve afectada durante el proceso de envejecimiento. Dado que esta innervación juega un papel importante tanto en la modulación como en la protección de las neuronas auditivas primarias, su alteración metabólica podría modificar profundamente el proceso auditivo (Vicente-Torres et al., 2001).

5.1.2. Estudio del efecto del sexo

En humanos, se han descritos múltiples ejemplos de este dimorfismo sexual (Gabory et al., 2009). En enfermedades comunes en las que se muestra un cierto grado de sesgo de sexo, como por ejemplo, los varones que se ven más afectados por tinnitus (Hasson et al., 2013) o que la prevalencia de la sordera aumenta con cada década de edad y es menor en mujeres que en varones (Agrawal et al., 2008). En Europa, el 30% de los hombres y el 20% de las mujeres, tienen una pérdida auditiva de al menos 30 dB(SPL) a la edad de 70 años (Roth et al., 2011). Este sesgo podría explicarse por el papel de los cromosomas sexuales o por el control de las marcas epigenéticas específicas del sexo (Gabory et al., 2009). Desde hace muchos años, ya se han sugerido posibles influencias de las hormonas ováricas sobre los potenciales evocados en el sistema auditivo (Coleman et al., 1994).

En general, y en el caso de los resultados obtenidos en el presente trabajo (Fig. 17, 18 y 19), los valores de los registros de hembras y machos son similares en todas las condiciones experimentales sin presentar muchas diferencias significativas entre ambos sexos. Sin embargo, en la literatura, existen numerosos estudios asociados a un dimorfismo sexual, y en concreto sobre la presbiacusia en humanos, en los que las ondas de los PEATC en ambos sexos, se manifiestan de forma diferente. Por ejemplo, en un estudio entre hombres y mujeres, mayores (60 a 79 años), de mediana edad (40 a 59 años) y jóvenes (20 a 39 años), los resultados indicaron que los adultos más mayores tenían latencias más largas en la onda III, que adultos de mediana edad o los jóvenes y que esas diferencias eran más significativas en hombres que en mujeres (Patterson et al., 1981). Este efecto se ha demostrado en otros estudios en los que la latencia de las mujeres se ha mostrado menor que la de los varones y sus ondas presentan mayores amplitudes (Jerger y Hall, 1980).

Los resultados revisados sugieren que el envejecimiento afecta a la transmisión neural sobre todo al nivel del complejo olivar COS (onda III) y que las latencias en los potenciales también están influenciadas por el sexo del individuo (Patterson et al., 1981). Esto se correspondería con la variabilidad intersexual que muestran los ratones C57BL/6J utilizados en el presente trabajo, en los que a los 6 meses de edad, los machos disminuyen la amplitud de la onda II y III al igual que con el tratamiento de GMS, mientras que las hembras parecen ver favorecido su nivel de

audición, presentando valores significativamente más elevados que los machos y que el propio grupo de hembras control de 6 meses.

Este dimorfismo sexual ha sido estudiado previamente en otros mamíferos, en la rata por ejemplo, donde se ha descrito un progresivo incremento, con la edad, de los niveles de dopamina en las fibras eferentes cocleares de hembras expuestas a trauma acústico respecto a los machos. Estos cambios podrían indicar un mecanismo de compensación para proteger a las neuronas aferentes tipo I frente a daños inducidos por la edad ([Vicente-Torres et al., 2002](#)).

Los machos parecen verse más afectados con el tratamiento, aunque los controles presenten mejores valores para la latencia y la amplitud. En todas las edades aumenta la latencia y sobre todo disminuye la amplitud tras el tratamiento con GMS, mientras que en las hembras el efecto excitotóxico del GMS no parece tener efecto negativo, sino que y en todo caso, se puede producir una mejora de los valores de amplitud.

Si se observan las gráficas, el análisis estadístico no evidencia diferencias significativas en los animales tratados con GMS porque al aumentar las hembras y disminuir los machos, llegan al mismo punto en el caso de los animales tratados. Este efecto se observa en la gráfica, pero no con el test estadístico.

Al aumentar la edad, las similitudes entre hembras y machos aumentan, siendo los valores obtenidos muy similares a los 12 meses entre ambos grupos, ya que se estaría produciendo una disminución en la protección por estrógenos en las hembras cuando sobrepasan la edad fértil ([Charitidi et al., 2009](#)).

5.1.3. Estudio del efecto del tratamiento

El tratamiento con GMS no provoca los mismos efectos en ambos sexos. Hay un comportamiento diferencial en cada uno. Las hembras no muestran diferencias significativas de los valores de los PEATC tras el tratamiento con GMS (Fig 20, 21 y 22), en ningún grupo de edad ni en ninguna de las ondas estudiadas, posiblemente por efectos de protección o modulación hormonal, que se explican más adelante, en este trabajo, en el análisis de las fases del ciclo estral. Por el contrario, el tratamiento tiene un efecto muy significativo en los machos, provocando una disminución de la amplitud sobretodo, de las ondas II y III, que disminuyen significativamente

al administrar GMS, mientras que la latencia permanece sin alteraciones estadísticamente significativas. Esto podría indicar que, aunque la señal neural recorra la vía auditiva, las neuronas glutamatérgicas podrían estar afectadas por excitotoxicidad. Este hecho ha sido descrito en experiencias previas de nuestro laboratorio en animales jóvenes ([Carricondo, 2000](#); [Carricondo et al., 2002](#)).

La neurotoxicidad inducida por GMS en las fibras aferentes de tipo I cocleares está relacionada con dos mecanismos indispensables en la transmisión de la señal desde la CCI hasta la neurona, los receptores glutamatérgicos del terminal dendrítico y los mecanismos de recaptación del GLU de la hendidura sináptica. En la cóclea, los receptores de GLU tienen un papel relevante en la activación neuronal y en los mecanismos de supervivencia, al estar involucrados en procesos de activación/depresión de las neuronas, remodelando el árbol sináptico ([Sánchez et al., 2015](#)). El GLU se relaciona con procesos de desarrollo y de neuroplasticidad, aprendizaje y memoria, encontrándose presente en toda la vía auditiva ([Gil-Loyzaga, 2009](#)) aunque en el proceso de envejecimiento muchas de estas funciones se ven alteradas.

La pérdida de sinapsis funcional en la cóclea, en lugar de la muerte de las células ciliadas, es el primer signo de daño tanto en el deterioro auditivo relacionado con el ruido como con la edad ([Kujawa y Liberman, 2009](#), [Sergeyenko et al., 2013](#)). En el ser humano este efecto se manifiesta como una pérdida de inteligibilidad del lenguaje, en especial, en condiciones ambientales ruidosas ([Sergeyenko et al., 2013](#)), y en el tratamiento con GMS podría estar sucediendo un efecto similar.

En la sinapsis glutamatérgica, la dendrita de la neurona tipo I posee los dos tipos de receptores glutamatérgicos, ionotrópicos y metabotrópicos ([Nakagawa et al., 1991](#); [Eybalin, 1993](#); [Puel, 1995](#)), que al igual que en el resto del SNC, realizarán funciones de activación y modulación de la señal distintas en la neurona tipo I del ganglio espiral coclear.

Los receptores glutamatérgicos ionotrópicos, se clasifican en NMDA (ácido N-metil-D-aspartico), AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionico) y el AK (ácido kaínico). De ellos, los receptores no-NMDA, los AMPA y AK, tienen un canal iónico asociado permeable a Na⁺ que se activa y abren cuando el receptor es activado por GLU o por cualquiera de sus agonistas específicos ([Puel, 1995](#)), produciendo respuestas rápidas en la transmisión del estímulo auditivo ([Sánchez et al., 2015](#)). Además, al administrar AMPA o AK en animales de

experimentación, se producen alteraciones en el potencial de acción compuesto del VIII par probablemente debidas al incremento activación de la neurona aferente de tipo-I. Si las dosis se prolongan, el proceso neurotóxico puede finalizar con la muerte de la fibra (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990; Puel et al., 1991b).

El receptor NMDA, está implicado en las respuestas lentas y tiene un canal iónico asociado, permeable a cationes como Na⁺, K⁺ y Ca²⁺, y un sitio de unión al GLU y otro para glicina que actúa como co-agonista del receptor (Sánchez et al., 2015), incrementando la frecuencia de apertura del canal (Johnson y Ascher, 1987) que, en condiciones de reposo, está bloqueado voltaje-dependientemente por Mg²⁺ (Mayer et al., 1984). Así, los receptores NMDA y no-NMDA formarían un complejo funcional (Puel, 1995) en el que la activación de los receptores NMDA dependería de la depolarización previa de la membrana provocada por la activación de los receptores no-NMDA, para desbloquear el canal NMDA y activarlo (Pujol et al., 1992; Puel, 1995).

Por otro lado, los receptores metabotrópicos de GLU de grupo I y II han sido descritos también en los terminales dendríticos de las fibras del VIII par. Estos receptores, acoplados a segundos mensajeros de proteínas G, tienen efectos más lentos que los producidos por los receptores ionotrópicos. Por esta razón, han sido relacionados con efectos sinápticos modulatorios de largo plazo (Oestreicher et al., 2002; Peng et al., 2004).

Hasta hace unos años, los receptores NMDA se relacionaban con la pérdida auditiva crónica que se sufre durante el envejecimiento, puesto que al ser de activación más lenta, actuarían reforzando la señal de los receptores AMPA y AK (Ruel et al., 2008). Se ha descrito incluso, que durante el envejecimiento cambian las subunidades del receptor. Así, se observa una gran disminución en la expresión de GluN1, la eliminación de GluN2A (Knipper et al., 1997; Ruel et al., 2008), y un aumento en las subunidades GluN2B, C y D (Puel, 1995; Ruel et al., 2008). Este cambio en el sistema de recepción glutamatérgica de la dendrita aferente en la sinapsis del sistema auditivo maduro, cambiaría la sensibilidad de la dendrita aferente, aumentando, por ejemplo, la probabilidad de generación de potencial de acción, la regulación de la latencia manteniéndola estable y contribuiría al desarrollo sináptico, la plasticidad, el procesamiento temporal y también estaría relacionado con varias patologías asociadas al envejecimiento del sistema auditivo (Sánchez et al., 2015). Este proceso de neo-sinaptogénesis y recuperación funcional probablemente

también podría representar la recuperación de la audición después de pérdidas temporales debidas a patologías relacionadas con excitotoxicidad (Puel, 1995). Además, estudios en ratones C57BL6J, han revelado que la pérdida auditiva asociada a la edad se produce únicamente a nivel periférico, manteniendo sus estructuras auditivas centrales en el estado adecuado para su edad (Frisina et al., 2011), y por tanto, los receptores y los neurotransmisores moduladores propios del sistema, entre ellos, los receptores NMDA podrían estar ejerciendo su efecto.

Por otra parte, la pérdida de fibras nerviosas por el efecto excitotóxico producido por la activación de los receptores AMPA y AK, reduce el número de fibras conectadas a cada CCI, disminuyendo así la amplitud de las ondas de los potenciales auditivos, aunque funcionalmente parece dejar un receptor auditivo normal (Young, 2013).

5.1.4. Estudio de los umbrales

En los seres humanos, la sensibilidad del umbral auditivo disminuye con la edad, con un peor pronóstico en hombres que en mujeres, y suele ser peor en las frecuencias más altas (Sergeyenko et al., 2013). En los ratones C57BL6J se produce el mismo efecto, aumentando su umbral auditivo en los PEATC durante el envejecimiento, indicando el desarrollo de la pérdida auditiva (Xue et al., 2016). En ambos grupos (Fig 23), hembras y machos, los umbrales más bajos son los de los grupos de animales más jóvenes, los machos 1 mes de edad y las hembras de 3 meses.

Sin embargo, cuando se produce una pérdida de las fibras nerviosas, por ejemplo por excitotoxicidad debida al GMS, se puede producir una pérdida auditiva cuyo umbral es normal, ya que si no se dañan demasiadas neuronas ganglionares, depende de que las CCI se activen, y estas pueden estar intactas (Young, 2013). Este hecho, explicaría que los ratones evaluados en la presente tesis, en ambos casos, tanto en machos como en hembras, con el tratamiento de GMS mantienen un umbral similar al de los grupos control.

5.1.5. Estudio electrofisiológico en función del ciclo estral

Efecto en función del sexo y el tratamiento a los 6 y 9 meses de edad

Las gráficas (Fig. 26, 27, 28 y 29) representan las dos variables obtenidas de los registros de PEATC, la latencia, es decir el tiempo (ms) que tarda en aparecer cada onda tras la estimulación acústica y la amplitud (μV), que equivaldría al número de neuronas que se activarían durante

cada estímulo. Así, un valor de amplitud de la onda estudiada mayor, estaría indicando más activación neuronal con el tratamiento de GMS, y una disminución de la misma, una menor activación neural o una posible pérdida de neuronas por efecto excitotóxico. Del mismo modo, con los valores de latencias aumentados, se obtiene una respuesta al estímulo acústico menos eficiente, posiblemente debido a una degeneración de las dendritas que conectan con las CCIs y una disminución de este valor, implicaría por tanto, una transmisión del mensaje más rápida y eficaz.

De este modo, mientras que los machos, como cabe esperar, aumentan su latencia y disminuyen su amplitud, tanto por el efecto dañino del tratamiento como por el efecto de la pérdida auditiva con la edad, la variación de hormonas durante el ciclo ovárico permite fluctuaciones en la función auditiva de las ratonas, que suceden también en mujeres adultas ([Parlee, 1983](#)).

Así, las hembras, presentan valores diferentes de latencia y amplitud en función de la fase estral en la que se encontraban cuando les fue administrado el GMS. Siendo el sistema auditivo más sensible durante el pico de estrógenos en circulación debido a su poder excitatorio y el efecto protector que genera en el SNC ([Al-Mana et al., 2008](#)). Este efecto protector tendría lugar en las hembras que se encontraban en fase de proestro-estro durante el tratamiento con GMS. Se han agrupado estas dos fases del ciclo, puesto que son aquellas en las que existe un pico de estrógenos, mientras que el grupo metaestro-diestro, presenta bajos niveles de esta hormona. (Fig. 7) ([Emanuele et al., 2002](#); [Caligioni, 2009](#)).

Por lo tanto, en las hembras en fase de proestro-estro, se observa un aumento tanto de la latencia como de la amplitud, tras el tratamiento, que podría enmascarar un posible efecto protector por parte de los estrógenos en mayor concentración en estas fases del ciclo estral, que evitarían la pérdida de neuronas expuestas a la excitotoxicidad, pero que por ese mismo efecto de protección, disminuiría la efectividad de la transmisión neural.

Tanto en la clínica como en estudios de modelos experimentales se han detectado numerosos ejemplos en los que se demuestra que los estrógenos protegen frente a la pérdida auditiva en las hembras de mediana edad ([Charitidi, 2009](#)). En mujeres, se han descrito incluso, cambios en el tiempo de respuesta en la percepción interaural y de localización del sonido durante de los ciclos menstruales. También latencias más cortas en los PEATC tras el tratamiento con estrógenos

o terapias hormonales sustitutivas, en mujeres postmenopáusicas (Charitidi, 2009). En ratas ovariectomizadas aumenta el umbral auditivo respecto a las controles al administrarles terapias sustitutivas (Coleman et al., 1994) y con la administración del antagonista del receptor de estrógenos, el tamoxifeno, se vieron afectadas las pruebas auditivas en ratas adultas (Thompson et al., 2006). Todos estos efectos, sugieren una posible protección del estradiol en el sistema auditivo femenino (Charitidi, 2009).

Los receptores de estrógenos α y β , son receptores nucleares, cuyos ligandos activan factores de transcripción (Charitidi, 2009). Los dos receptores se encuentran en cromosomas separados y tienen distinta longitud sus dominios, por lo que se cree que pueden tener efectos contrapuestos (Hultcrantz et al., 2006; Charitidi, 2009). La presencia de esos dos tipos de receptores, en varias regiones de la cóclea de mamíferos (Stenberg et al., 1999; Stenberg et al., 2001), sugiere también que los niveles de estrógenos puedan estar interviniendo en el balance electrolítico y el flujo de líquidos endolinfáticos (Lee and Marcus, 2001) así como en el flujo sanguíneo que llega a la cóclea (Laugel et al., 1987). En este sentido, la aldosterona, hormona esteroidea que ejerce un control primario sobre las concentraciones de Na^+ y K^+ en el organismo, podría estar interactuando con los niveles de estrógenos cocleares. Estudios de ratones CBA/CaJ, con pérdida auditiva neurosensorial autoinmune, tratados con aldosterona mejoraron sus umbrales auditivos tras el tratamiento que afecta mucho a la estría vascular, tejido que regula estos iones en la cóclea (Frisina y Frisina, 2013). Estos efectos también están modulados por la vasopresina, ya que el flujo sanguíneo que llega al cerebro y a la cóclea es mayor en hembras con niveles de estrógenos altos, mientras que con la menopausia, sus niveles vuelven a ser como los de los machos (Kilicdag et al., 2004).

Sin embargo, en las hembras tratadas con GMS en fase de metaestro-diestro, presentan diferencias de latencias que también han sido encontradas en mujeres en fase periovulatoria y la fase luteal y que podrían indicar que el aumento de progesterona en esta fase del ciclo, inhibe el efecto del estrógeno y su acción en la vía auditiva (Al-Mana et al., 2008). Así, en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se observa una disminución en la amplitud, que representa que el número de neuronas activadas, pero compensada por una mayor eficacia de la transmisión del estímulo auditivo, puesto que sus valores de latencia disminuyen tras el tratamiento con

GMS. Este efecto podría implicar una afectación mayor debida a los efectos del GSM, debido a que en estas hembras podría haber una menor concentración de estrógenos en esta fase del ciclo estral. Este efecto se ha comprobado también en mujeres en las que bajos niveles de estrógenos durante la fase pre-menstrual podrían indicar menos sensibilidad a la función auditiva (Al-Mana et al., 2008). Además las mujeres en fase lútea, es decir, con más nivel de progesterona, presentan latencias más elevadas en PEATC (Price et al., 2009).

En general, la progesterona tiene un papel inhibitorio sobre el SNC, y hace balance con el efecto excitatorio de los estrógenos (Katzenellenbogen, 2000), al ser agonista de los receptores GABA A (Follesa et al., 2001), el receptor principal del efecto inhibitorio del sistema auditivo (Tang, et al., 2014). Sin embargo, forma parte de las terapias de regulación hormonal que se administran a mujeres, pudiendo dañar los receptores de estrógenos o desregulando su efectos protectores con efectos negativos (Price et al., 2009). Se ha demostrado que las mujeres que utilizan anticonceptivos orales, que disminuyen los estrógenos, tienden a estar más cercanas a los hombres en sus umbrales auditivos (McFadden, 2000).

Valorando el efecto del envejecimiento en las hembras en fase de metaestro-diestro, a los 9 meses parecen disminuir también la latencia, mejorando la eficacia del sistema auditivo, y sin embargo, mantienen sus valores de amplitud similares. Por el contrario, las hembras en fase de proestro-estro, a los 9 meses aumentan su latencia y disminuyen la amplitud, tras el tratamiento con GSM, pudiendo estar ambos efectos relacionados con una disminución general en la respuesta del SNC, a los estrógenos asociada una disminución de sus receptores con la edad (Motohashi et al., 2010), que también se produce de manera brusca, tras la menopausia, en las mujeres (Cooper et al., 1999).

A las mujeres menopáusicas a las que se administra una terapia de reemplazamiento hormonal mantienen “joven” su sistema auditivo durante más tiempo (Hultcrantz et al., 2006) demostrando que existe un mecanismo protector de las hormonas esteroideas frente al envejecimiento. Este efecto también se observa en animales de experimentación peri-menopáusicos (Cooper et al., 1999; Price et al., 2009).

5.1.6. Estudio electrofisiológico de la evolución de la edad

Efecto del Sexo

En los resultados que aquí se exponen, se ha observado que hembras y machos control tienen valores de latencia diferentes a lo largo de la edad. Siendo los machos mucho más estables, van aumentando sus latencias a un ritmo constante en todas las ondas, mientras que las hembras presentan una latencia mínima a los 3-6 meses y a partir de esa edad, y sobre todo a los 9 meses, aumenta de forma brusca en las tres ondas estudiadas.

Como se ha descrito previamente, hay numerosos estudios que hablan de las propiedades de los estrógenos, como protectores de la función auditiva, actuando sobre el sistema eferente olivococlear medial, y también de cómo preservan los umbrales auditivos ([Hederstierna, 2010](#)). También se ha comprobado que mantienen las latencias de los PEATC más bajas durante más tiempo en las mujeres ([Charitidi, 2009](#)) hasta que éstas sufren la menopausia y es solo entonces cuando sufren los efectos de la presbiacusia ([Hultcrantz et al., 2006](#)), hasta alcanzar los niveles de pérdida auditiva de los hombres de su misma edad ([Kilicdag et al., 2004](#)).

Se ha demostrado que al administrar una terapia de reemplazo hormonal durante la menopausia a mujeres ([Hultcrantz et al., 2006](#)) y ratonas ([Price et al., 2009](#)), mejoran su función auditiva respecto a las que no tienen el tratamiento ([Kilicdag et al., 2004](#)). Sin embargo, hay cierta controversia, ya que otros estudios exponen que el estradiol administrado en suero en mujeres postmenopáusicas, podría aumentar el riesgo de pérdida auditiva ([Kim et al., 2002](#)) pero, con una evolución aguda y repentina, que nada tendría que ver con la presbiacusia asociada al envejecimiento, de carácter más lento y progresivo ([Hultcrantz et al., 2006](#)).

En los resultados obtenidos se observa que las amplitudes de los animales controles a edades avanzadas son similares en hembras y machos, así como en mujeres y hombres ([Hultcrantz et al., 2006](#)). La mínima amplitud en ambos grupos es a los 9 meses, pero es mucho más exacerbada en el caso de las hembras tratadas, puesto que a esta edad ha disminuido mucho su nivel de estrógenos endógenos, por lo que se verán más afectadas por el GMS, pero la amplitud máxima observada a los 3-6 meses en machos y hembras control podría deberse a que a esta edad se llega al mayor grado de maduración del sistema y una mejora del rendimiento total de la función auditiva. Estos datos concuerdan que hay un factor muy importante en la audición relacionado con el cambio hormonal que puede verse también en las mujeres ([Hultcrantz et al., 2006](#)).

Efecto del Tratamiento

Los datos obtenidos sugieren una mayor sensibilidad de las neuronas glutamatérgicas al GLU al envejecer, posiblemente debido al deterioro de los sistemas de estabilización neuronal tras la estimulación sináptica con dicho neurotransmisor. La reducción de la actividad inducida en las neuronas auditivas además podría reducir el efecto activador que estas neuronas deben ejercer sobre las del tronco y por lo tanto afectar a la percepción del mensaje auditivo.

Este hecho explicaría un aumento de latencias general a lo largo de la edad que va aumentando de forma progresiva en los machos de 1 mes hasta los de 12 meses, mientras que para las hembras este efecto, aunque también se produce, el aumento de las latencias lleva una progresión más acusada, mucho mayor desde los 3 meses (Charitidi, 2009), mientras que las hembras, no ven alteradas sus latencias tras el tratamiento de GMS, posiblemente debido a un efecto modulador producido por los estrógenos (Price et al., 2009). Se observa también una pequeña activación de neuronas, consecuente con un aumento de la amplitud en hembras de 12 meses tras el tratamiento.

Los machos tratados aumentan de manera general su amplitud en todas las edades, salvo los individuos de un mes, en los que disminuye con el tratamiento de GMS. Este aumento de amplitud podría ser debido a un aumento de la activación neuronal producido en las fibras aferentes que aun no han sufrido degeneración por el efecto de la excitotoxicidad, mientras que en las hembras, se mantienen sin efectos aparente hasta los 12 meses, en las que parecen ser similares a los machos, aumentando su amplitud con el tratamiento.

5.2. RESULTADOS MORFOLÓGICOS

5.2.1. Análisis del receptor auditivo. tinción de hematoxilina-eosina:

La evaluación cualitativa de la tinción con hematoxilina-eosina de las secciones midmodiolares de cóclea pone de manifiesto los efectos histopatológicos principales hallados en las muestras.

Evolución de la variabilidad debida a la edad:

Al comparar la cóclea en una hembra joven de 1 mes con una de 12 meses (Fig. 33) se observan diferencias muy evidentes en cuanto al estado de las mismas y al envejecimiento prematuro que

sufren estos animales. Con la edad se produce una pérdida auditiva en el ratón C57BL6/J producida por, entre otras cosas, un deterioro de las CCEs, que comienza con la CCE más externa, la media y la CCE más interna, para continuar con la CCI y posteriormente con la degeneración de las neuronas del ganglio espiral (Yamasoba et al., 2007; Park et al., 2010; Carricondo y Romero-Gómez, 2017)., como se aprecia en las figuras 34, 35, 36 y 37, de los ganglios espirales cocleares.

La hembra de 1 mes presenta intactos el órgano de Corti y el ganglio espiral de las tres rampas cocleares (Fig. 33). Sin embargo, la degeneración celular comienza a la edad de 6-9 por la espira basal (Yamasoba et al., 2007) continuando su desarrollo hasta la espira apical cuando se agrava la patología con la edad. De manera que los ratones C57BL6J a los 12 meses, tal y como se observa en la figura 33, presentan gran afectación en su ganglio espiral basal y medial, prácticamente sin neuronas, y faltando la gran mayoría en el apical. Además, carece de órgano de Corti en todas las espiras, habiendo sido sustituido este por un engrosamiento de la membrana basilar a modo de cicatriz (Bartolomé et al., 2002). La pérdida auditiva asociada a la edad, que se produce en estos animales, comienza con las frecuencias más agudas, como en la presbiacusia humana (Park et al., 2010). Estas características hacen que el ratón C57BL6J sea un modelo experimental de patologías asociadas al envejecimiento, y que, gracias a su mutación en la cadherina 23, sea ideal, en concreto, para modelizar la presbiacusia humana (Wong y Ryan, 2015). Se emplean otros modelos experimentales para el estudio del envejecimiento auditivo, como los ratones CBA, pero estos últimos, presentan la patología auditiva a los 18 meses de edad (Bowl y Dawson, 2015), lo que supone mucho más tiempo hasta que el animal desarrolla la enfermedad y menos tiempo para su estudio (Park et al., 2010).

Evolución de efecto del GMS:

Al valorar los efectos producidos por la administración de GMS en los ratones C57BL6J, se observa en las Figuras, 34, 35, 36 y 37 que la pérdida neuronal, se produce de manera homogénea en las tres espiras cocleares, en algunos casos incluso presentan más afectación las espiras apicales, que las medias o las basales. Este efecto indicaría una posible toxicidad independiente de los cambios producidos por el envejecimiento, puesto que en la presbiacusia la última espira en verse afectada por la patología, es la apical, mientras que el efecto excitotóxico producido por el GMS podría afectar a todas las espiras del mismo modo.

Sin embargo, en ambos sexos parece verse más afectado el animal por la administración de GMS a partir de los 9 meses, lo que podría indicar que con la edad estos animales serían más sensibles a la sobreexposición al glutamato y por tanto al ruido. Se ha descrito que la exposición al ruido en modelos experimentales de chinchillas causa pérdida de CCEs, principalmente por procesos de apoptosis (Nicotera et al., 2003), pero los principales mecanismos de pérdida de neuronas del ganglio espiral parecen ser debidos a la excitotoxicidad producida por la liberación de GLU durante la exposición acústica (Puel et al., 1994). Además, en condiciones experimentales, se ha descrito que la administración de altas dosis de GLU o cualquiera de sus análogos (NMDA, AMPA o AK) producen procesos similares de degeneración neuronal (Olney, 1969; Olney et al., 1986).

Por otra parte, la pérdida de fibras nerviosas, conectadas a las CCI, al ser un sistema redundante y estar conectadas 10-30 neuronas por CCI, aunque disminuya en número con estos efectos, la cóclea se mantiene funcional mucho más tiempo, (Young, 2013), permitiendo la estimulación auditiva, aunque ésta pierda calidad durante el envejecimiento del receptor o tras los efectos excitotóxicos de la administración de GMS.

El efecto del tratamiento y sus mecanismos de excitotoxicidad se añadirían aun así, a los efectos principales de pérdida neuronal del ganglio espiral debidas al envejecimiento propio del animal, de manera que los animales se ven más afectados, por el tratamiento con GMS, en el periodo en el cual los efectos propios de la sordera por envejecimiento comienzan a presentarse, que sucede en el ratón C57BL6J a los 9 meses. Estos resultados sugieren que el primer signo de manifestación de la sordera debida al envejecimiento sería la pérdida de sinapsis funcionales entre las CCIs y las aferencias de tipo-I, en lugar de la muerte de las células ciliadas que sería un evento posterior, tanto en el deterioro auditivo relacionado con el ruido como con la edad (Kujawa y Liberman, 2009; Sergeyenko et al., 2013).

Evolución de la variabilidad debida al sexo:

En general, los procesos de la sordera ligada al envejecimiento del modelo animal utilizado en la presente Tesis Doctoral, son diferentes en machos y hembras. El grupo de machos parecen tener una pérdida homogénea de neuronas en el ganglio espiral (Fig. 33), mientras que las hembras presentan una pérdida neuronal muy drástica a partir de los 9 meses de edad (Fig. 33).

Como se ha comentado previamente, en los machos la degeneración neuronal en el ganglio espiral es un proceso lento y progresivo, que comienza de forma muy temprana y va afectado a los animales con la edad, mientras que en las hembras, este proceso es muy distinto (Al-Mana et al., 2010). Éstas mantienen la integridad de sus estructuras, hasta la etapa en la que comienzan a dejar de ser fértiles, en la que sus niveles de estrógenos disminuyen y la presbiacusia de las ratonas se convierte en un proceso mucho más acelerado, igualándose e, incluso, en algunos casos, superando a los machos en la pérdida auditiva, tal y como se observa en la figura 33, en la degeneración neuronal que se produce en el ganglio espiral coclear en la hembra de 9 meses (Hultcrantz et al., 2006; Hederstierna et al., 2010).

5.2.2. Análisis del complejo olivar superior. tinción de violeta de cresilo

La observación de las características y el estado general de una porción del complejo olivar superior (COS) mediante tinción de las secciones coronales del SNC obtenidas con violeta de cresilo, mostró la existencia de alteraciones en el tejido nervioso de todos los animales, hembras y machos, a los que se les administró GMS, mientras que en ningún animal control se observaron estos daños (Fig. 38).

Estas lesiones observadas en el SNC, a la altura del COS, producidas con el tratamiento de GMS, son formaciones edematosas, similares a las producidas en otras condiciones patológicas, como por ejemplo el déficit de tiamina o vitamina B1 (Vortmeyer y Colmant, 1988), causa fundamental del síndrome de Wernicke-Korsakoff, asociado en ocasiones a problemas auditivos o de comprensión del lenguaje (Jethava y Dasanu, 2012; Lamdhade et al., 2014). Este déficit de vitamina B1 parece acarrear también una pérdida de neuronas en el tronco cerebral, en la zona del COS. La formación de estructuras globosas y la posible presencia de astrocitos edematosos en el interior de las mismas (Fig. 38) tras la administración de GMS, sugiere que el sistema olivococlear (COS) juega un papel importante en la protección de la cóclea de la exposición a condiciones de estrés oxidativo y/o altos niveles de ruido (Fuente, 2015).

Se ha demostrado que el estrés oxidativo tiene lugar en la célula cuando no hay un balance adecuado entre la generación y eliminación de ROS (Zeng et al., 2014). Puede producirse mediante tóxicos o moléculas exógenas, como por ejemplo la D-galactosa, molécula que se transforma en galactitol, que no puede ser metabolizado por la célula y cuya acumulación induce

estrés oxidativo. Esto se ha observado también en las vías auditivas centrales, viéndose afectado por apoptosis el núcleo coclear ventral (Du et al., 2015b).

Varios estudios han demostrado que las ROS se generan en la cóclea por exposición a altas intensidades de sonido, acumulando cambios ultraestructurales y, consecuentemente, funcionales que afectan a toda la vía auditiva llegando a producir apoptosis en el cortex cerebral, generando también presbiacusia central (Zeng et al., 2014).

Tal y como se ha comentado anteriormente, del COS parten fibras nerviosas eferentes a la cóclea, que inervan las dendritas de las neuronas de tipo-I del ganglio espiral y las CCEs del órgano de Corti (Gil-Loyzaga et al., 2000). Todas las sustancias neuroactivas, acetilcolina, GABA, dopamina, encefalinas, dinorfinas y CGRP, que se han encontrado en estas fibras eferentes (Gil-Loyzaga et al., 1988; Gil-Loyzaga y Parés-Herbute, 1989; Merchán-Pérez et al., 1990a; 1990b; 1990c; 1993; 1994; Gil-Loyzaga et al., 1997b; Vicente-Torres et al., 1998) podrían estar involucradas en la modulación de la actividad de las fibras aferentes primarias, axones eferentes que parten del COS L así como la actividad de las CCEs por parte de las fibras que proceden del COS M (Gil-Loyzaga, 1995).

Un buen ejemplo es la dopamina (DA) coclear. Está bien descrito, como la estimulación sonora da como resultado un aumento de la DA en el receptor auditivo. Esto indica la liberación de DA por parte de las fibras COS. La DA actuaría sobre receptores D-2, ya que la administración de piribedil, un agonista D-2, bloquea los efectos del ruido en la cóclea, mientras que la estimulación del receptor D-1 no modifica la recirculación coclear de la DA inducida por el ruido (Gil-Loyzaga et al., 1994). Por lo tanto, la DA podría desempeñar un papel importante en la modulación y la protección contra el ruido de las aferencias (Gil-Loyzaga, 1995). Otro ejemplo, sería la serotonina (5-HT), que es liberada por fibras que provienen de la región periolivar del COS y que estarían involucradas también en sistemas de vigilancia, atención, y el estado de urgencia antes del proceso de transducción en el receptor auditivo (Bartolomé y Gil-Loyzaga, 2005), y que dada la situación de las lesiones producidas por la administración de GMS observadas en los resultados aquí presentados, podrían verse alteradas también en estas condiciones patológicas de excitotoxicidad. Aunque para valorar adecuadamente este efecto sería necesaria una mayor muestra, que permita, mediante técnicas de morfometría, valorar el alcance de las lesiones producidas en la vía auditiva y relacionarlas también con una posible sensibilidad a la excitotoxicidad durante el envejecimiento.

Los resultados electrofisiológicos obtenidos tras el registro del PEATC indican también una mayor afectación en la onda III. Clásicamente se asignan las características de esta onda III del PEATC a la actividad general del COS corroborando, por tanto, ese efecto dañino observado en la microscopía en el COS tras el tratamiento de GMS (Fig. 39, 40, 41 y 42). Según todos los indicios, el tratamiento con GMS generaría una sobre-estimulación de la vía aferente desde la cóclea, que a su vez y gracias al arco reflejo establecido por los axones eferentes del COS que inervan la cóclea, sobreactivaría a su vez el sistema eferente coclear de modulación-protección. Esta sobrecarga del sistema, generaría una grave situación de estrés oxidativo en el COS, que se traduciría en el edema, inflamación y apoptosis de las neuronas que modulan la activación de las vías aferentes, y que se observa en los resultados obtenidos.

Otro efecto posible, que tendría lugar tras la alta exposición a GMS exógeno, sería una sobreactivación neuronal en las propias neuronas glutamatérgicas que se sitúan en el COS y que afectaría también a sus receptores NMDA. Los cambios de subunidad que se han descrito en la bibliografía científica y que se suceden en este receptor durante la maduración del sistema auditivo (Puel, 1995; Knipper et al., 1997; Ruel et al., 2008), y que conllevan un aumento de la actividad del sistema, como mecanismo compensatorio de la pérdida de sinapsis con la edad (Kujawa y Liberman, 2009; Sergeyenko et al., 2013), podrían estar aumentando la sensibilidad al tratamiento con GMS tanto en el CT, como al COS M y COS L, (Sánchez et al., 2015) de forma tan brusca, que se producirían los efectos de excitotoxicidad a este nivel de la vía auditiva.

Para la realización de la presente Tesis Doctoral, se han valorado los daños observados en el COS, el COS L y el COS M, así como en el NMCT, pero tal y como se ha comentado previamente y se puede observar en la figura 38, el tratamiento con GMS parece haber afectado a otras áreas de la vía auditiva, como el núcleo coclear. Quedan pendientes para futuros estudios, el análisis cuantitativo y cualitativo de estos efectos obtenidos y aquí presentados.

5.2.3. Análisis de la expresión de diferentes marcadores en la cóclea mediante técnicas inmunohistoquímicas

Hoy en día, está bien establecido que la presbiacusia humana tiene un fuerte componente genético y que la patogenia está relacionada con mecanismos de apoptosis (Adams, 2003; Nevado et al., 2006; Dong, 2014). La apoptosis aquí implicada parece estar inducida por las dos vías apoptóticas (Tadros et al., 2008) y, además, puede estar combinada con mecanismos de inmu-

A. CONTROLES E. Apical	NF-200	Enolasa	Bcl-2	BAX	Caspasa 3	Caspasa8	Caspasa9
1mes Hembra		/	/	*	/	/	*
1mes Macho	*		*	*	**	/	
3meses Hembra	*	/	/	*	/	/	/
3meses Macho	****	/	*	/	***	/	**
6meses Hembra	*	**	/	***	*	/	*
6meses Macho	***		*	*	**	/	**
9meses Hembra	/	*	**	/	***	*	/
9meses Macho	*	/	*	/	/	/	*
12meses Hembra	***	/	*	/	***	/	*
12meses Macho	*	*	/	/	*	*	*

A. CONTROLES E. Medial	NF-200	Enolasa	Bcl-2	BAX	Caspasa 3	Caspasa8	Caspasa9
1mes Hembra		*	/	*	/	/	*
1mes Macho	*		*	*	*	*	
3meses Hembra	*	*	/	/	/	*	*
3meses Macho	***	*	**	*	***	*	**
6meses Hembra	*		*	*	*	/	*
6meses Macho	***	*	*	*	**	**	**
9meses Hembra	/	*	*	*	***	*	*
9meses Macho	*	*	*	/	*	/	*
12meses Hembra	*	*	*	*	***	*	
12meses Macho	/	/	*	/	*	*	/

A. CONTROLES E. Basal	NF-200	Enolasa	Bcl-2	BAX	Caspasa 3	Caspasa8	Caspasa9
1mes Hembra	/	/	/	*	/	/	*
1mes Macho	/		/	*	*	*	
3meses Hembra	*	/	*	/	*	**	/
3meses Macho	**	*	/	/	***	**	**
6meses Hembra	*		*	*	*	*	/
6meses Macho	***	*	*	*	**	*	*
9meses Hembra	*	*	/	/	***	*	*
9meses Macho	/	*	*	*	*	*	*
12meses Hembra	*	*	/	*	***	*	*
12meses Macho	/	*	*	*	*	*	/

Figura 71: Tabla de marcaje de los diferentes anticuerpos analizados en cada espira del ganglio espiral co-clear. Apical, medial y Basal. Grupo de animales Controles. Valoración de la expresión de cada anticuerpo en la muestra.

* = Poca expresión; ** = Bastante expresado; ***= Muy expresado; ****= Expresión máxima; / = No se evidencia expresión

A. TRATADOS E. Apical	NF-200	Enolasa	Bcl-2	BAX	Caspasa 3	Caspasa8	Caspasa9
1mes Hembra	****	*	/	***	***	/	/
1mes Macho	/	*	***	*	*	*	*
3meses Hembra	****	**	*		/	/	
3meses Macho	****	**	*	**	/	**	
6meses Hembra	***	*	*	*	***	*	
6meses Macho	**	*	*	/	***	*	*
9meses Hembra	****	*	/	*	*	/	*
9meses Macho	****	*	*	***	***	*	***
12meses Hembra	*	*	*	*	***	*	*
12meses Macho	**	/	/	*	/	*	*

A. TRATADOS E. Medial	NF-200	Enolasa	Bcl-2	BAX	Caspasa 3	Caspasa8	Caspasa9
1mes Hembra	****	*	/	/	***	/	/
1mes Macho	*	*	***	*	*	*	*
3meses Hembra	****	*	/	***	*	/	*
3meses Macho	****	/	*	**	/	*	
6meses Hembra	***	*	*	*	***	/	/
6meses Macho	**	*	*	/	***	*	*
9meses Hembra	***	*	/	/	**	/	*
9meses Macho	****	/	**	***	***	**	**
12meses Hembra	**	*	/	/	***	/	*
12meses Macho	*	/	/	*	/	**	*

A. TRATADOS E. Basal	NF-200	Enolasa	Bcl-2	BAX	Caspasa 3	Caspasa8	Caspasa9
1mes Hembra	****	/	/	/	***	/	*
1mes Macho	*	*	***	*	*	/	*
3meses Hembra	****	*	*	***	/	*	**
3meses Macho	***	/	**	/	*	**	
6meses Hembra	***	*	/	*	***	**	*
6meses Macho	*	/	/	*	***	/	*
9meses Hembra	***	*	/	*	**	/	*
9meses Macho	****	/	*	***	***	*	***
12meses Hembra	***	*	/	/	***	*	*
12meses Macho	***	*	/	/	*	**	*

Figura 72: Tabla de marcaje de los diferentes anticuerpos analizados en cada espira del ganglio espiral co-clear. Apical, medial y Basal. Grupo de animales Tratados. Valoración de la expresión de cada anticuerpo en la muestra.

* = Poca expresión; * * = Bastante expresado; *** = Muy expresado; **** = Expresión máxima; / = No se evidencia expresión

nodegeneración que han sido descritos en ratones SAMP1, y que también se producen durante el envejecimiento y acompañan al proceso inflamatorio (Dong et al., 2014).

En este caso, el proceso de pérdida auditiva está asociado a muchos cambios bioquímicos y moleculares, incluyendo un aumento en el daño del ADN mitocondrial y una reducción de su función (Yamasoba et al., 2007; Xue et al., 2016), por la acumulación de ROS en la mitocondria, que generan estrés oxidativo, y que aumentan con el envejecimiento (Nevado et al., 2006; Han et al., 2015). El estrés oxidativo que se produce en la cóclea con la edad induce también alteraciones en el ADN de los ratones C57BL/6J y juega un papel fundamental en el inicio del proceso presbiacúsico por medio de mecanismos de apoptosis (Someya et al., 2009; Xue et al., 2016).

a) Análisis de la detección inmunohistoquímica de Caspasa 3:

La caspasa 3 tiene un papel muy importante en la presbiacusia, ya que se ha correlacionado su aumento de expresión genética (Nevado et al., 2006) en la cóclea (Tadros et al., 2008) y en las neuronas del ganglio espiral con la edad (Frisina et al., 2016). Este hecho correlaciona con los resultados obtenidos en el presente estudio, en los que se observa que en los animales de los grupos control, el marcaje de caspasa 3 en el ganglio espiral coclear parece estar relacionado con la edad del animal, encontrando mayor expresión a mayor edad del animal, siendo, a su vez, más abundante en machos que en hembras. De hecho, mientras que en los machos, el marcaje con caspasa 3 comenzaría a la edad de 3 meses, en las hembras no existe prácticamente marcaje de muerte celular, determinado por la presencia de caspasa 3, hasta los 9 y 12 meses de edad, cuando este efecto se iguala en ambos sexos (Fig. 43, 44, 45 y 46).

Este aumento de la apoptosis con la edad ha sido previamente descrito en este modelo animal de ratón C57BL/6J en los que se encontró mayor expresión de caspasa 3 a partir de los 6 meses, siendo más evidente a los 9 y 12 meses (Wang et al., 2012) al producirse la pérdida de las células sensoriales, las células de soporte o las neuronas del ganglio espiral descrita, por posibles procesos de apoptosis, tal y como se ha observado en las muestras de la presente Tesis Doctoral. Otros estudios han descrito efectos protectores frente a la apoptosis de células ciliadas y neuronas de la cóclea, al inhibir la activación de caspasa 3 (Wang et al., 2012; Wang et al., 2015). La caspasa 3 ha sido descrita como proteasa efectora en las dos vías apoptóticas e interviene, además, en el desarrollo embrionario del oído de humanos, existiendo apoptosis

durante su desarrollo (Tafrá et al., 2014). Se ha observado también que ratones knockout para caspasa 3 presentan un desarrollo inadecuado de las células ciliadas del órgano de Corti y del ganglio espiral coclear, que conlleva una pérdida auditiva por hiperplasia de las células de soporte (Tafrá et al., 2014). También se ha encontrado marcaje positivo para caspasa 3 en las CCEs de ratones C57BL/6J desde 1 mes de edad y en mayor medida que en los ratones CBA, que también se emplean para estudios de pérdida de audición asociada al envejecimiento (Park et al., 2010). Estos datos demuestran, por lo tanto, un inicio del proceso apoptótico muy precoz con la edad en estos ratones, que se correlaciona con los resultados obtenidos en el presente estudio, en los que la caspasa 3 es constante y se marca positivamente en todas las edades tanto en machos como en hembras, teniendo, su expresión, un claro aumento durante el envejecimiento. Aunque en el caso de las hembras este proceso pueda mantenerse estable a una edad más tardía por un posible efecto protector hormonal.

Por otro lado, los animales tratados con GMS parecen presentar una mayor expresión de caspasa 3 a los 9 y 12 meses, en el ganglio de todas las espiras cocleares, indicando un mayor grado de apoptosis y, por tanto, una mayor sensibilidad a la sobreexposición al GLU. La expresión de caspasa 3 tras sobreexposición al ruido también se ha evaluado en otros estudios con cobayas en los que se ha detectado esta caspasa solo unas horas después de la sobreexposición sonora (Nicotera et al., 2003).

Los presentes resultados, sugieren que la caspasa 3 es fundamental para el desarrollo y la maduración del oído a lo largo de la vida del individuo, y que actúa por varios mecanismos de activación, siendo imprescindible estudiarla tanto en la patología del envejecimiento como en el trauma acústico.

b) Análisis de la detección inmunohistoquímica de Caspasa 9:

Los ratones de este estudio, presentan un marcaje muy positivo y similar para la expresión de caspasa 9, incluso en aquellos tratados con GMS. Esto indica que dicha apoptosis no parece debida al efecto del tratamiento exclusivamente, si no que se podría relacionar con la apoptosis programada que se produce en la cóclea de los ratones C57BL6J a los largo de la edad. Como sucede en otros trabajos, en los que no hay tratamiento de GMS, la caspasa 9 activa se expresa más en individuos más mayores (Wang et al., 2015), lo que demuestra que la apoptosis debida al envejecimiento es fundamentalmente de vía intrínseca (Nevado et al., 2006).

El hecho de que a los 12 meses de nuevo las muestras vuelvan a estar muy poco marcadas recuperando los valores de marcaje de los primeros meses de vida podría estar indicando ya una pérdida neuronal muy grave, relacionada con la gran pérdida funcional auditiva que sufren estos animales (Fig. 47, 48, 49 y 50) (Castillo et al., 2006).

Es imprescindible tener en cuenta también que la vía de apoptosis producida por estrés oxidativo, activa típicamente la caspasa-9, que activará a su vez a las caspasas efectoras 3 y 7 (Adams, 2003) y que por lo tanto, el marcaje de caspasa 9 estaría indicando también la apoptosis por esta ruta de estrés oxidativo. Además tanto en procesos de necrosis de las CCEs como en apoptosis, se produce la liberación de citocromo C, necesario para que se produzca la formación del apoptosoma y la consiguiente activación de la caspasa 9 y contribuir a la vía de activación de apoptosis mitocondrial intrínseca (Nicotera et al., 2003). Este hecho puede indicar que la apoptosis sucede por varias vías de activación en el proceso de envejecimiento de la cóclea (Park et al., 2010).

Por otra parte, tanto la caspasa 8 como la caspasa 9 se activan en cobayas sometidas a ruido excesivo con un patrón similar al de la caspasa 3 (Nicotera et al., 2003). Esto correlacionaría con el aumento de neuronas positivas a la caspasa 9 que se detectan en los ratones tratados con GMS, cuyo efecto excitotóxico es similar al producido en el trauma acústico. Este efecto además, parece producirse en mayor medida en los machos tratados que en las hembras, pudiendo deberse al efecto protector, frente al envejecimiento y el trauma acústico, que se da en las hembras con mayor actividad hormonal.

c) Análisis de la detección inmunohistoquímica de Caspasa 8:

Al contrario de lo que cabría esperar, en los resultados obtenidos, la expresión de caspasa 8 (Fig. 50, 51, 52 y 53) no parece aumentar con la edad del animal. Este efecto, se corrobora en la bibliografía científica consultada, ya que se ha descrito que en los ratones C57BL6J, la expresión de caspasa 8 no cambia con la edad, sino que se mantiene constante en todos los grupos estudiados (Nevado et al., 2006; Wang et al., 2015). Así, el marcaje de caspasa 8 es positivo solo en células de forma aislada, siendo algo más abundante en el grupo de machos, que a su vez, parecen aumentar sus positivos tras el tratamiento con GMS en todas las edades, y en especial a los 9 meses. Se ha descrito que la activación de caspasa 8 indica procesos de

isquemia que se dan en la cóclea tras la exposición al ruido (Nicotera et al., 2003) proceso que sería muy parecido fisiopatológicamente a la administración de GMS, como en los ratones tratados con GMS en nuestro estudio.

La activación de la caspasa 8 podría relacionarse, por tanto, con mecanismos de inflamación y estrés oxidativo inducidos por un aumento de GLU endógeno, en presencia de ruido, o exógeno, debido al tratamiento con GMS, en la sinapsis entre la CCI y la dendrita aferente de tipo I, que provocaría la muerte celular de gran parte de las CC. Este proceso como un equilibrio entre apoptosis y necrosis, siendo ambas reguladas de forma recíproca (Zheng et al., 2014).

En los resultados aquí presentados, se observa que las hembras, expresan más marcaje a partir de los 9 meses, demostrando una vez más que en ellas esta presbiacusia experimental, se produce de forma más brusca que en los machos y que en la fase peri-menopáusica son más vulnerables a efectos patológicos, mientras que las hembras jóvenes parecen no desarrollar la patología, y ni siquiera, al tratarlas con GMS, parece aumentar el número de células en proceso de apoptosis vía extrínseca o inflamatoria.

Estudios realizados en ratas Sprague-Dawley han descrito en la cóclea una disminución significativa de ATP y un aumento de ADP, junto con un aumento de la actividad de las caspasas efectoras durante el envejecimiento. El ratio ATP/ADP puede determinar el grado de muerte o supervivencia celular que existe en las células. (Nevado et al., 2006). Mientras que en otros estudios con ratones CBA/J adultos, sometidos a trauma acústico, se ha observado que existe una disminución del ATP en las CCEs de la cóclea en condiciones de isquemia, indicando que la disminución de la energía celular provocada puede producirse por necrosis o apoptosis (Zheng et al., 2014).

La apoptosis de las cócleas de los ratones C57BL/6J, que ocurre con la edad, es dependiente de la vía intrínseca o mitocondrial, pero depende también o tiene una reacción cruzada con el estrés oxidativo producido en la mitocondria o en el RE, y que se ve aumentado con la edad, tanto en las cócleas como en la vía auditiva de estos ratones y que regula el ratio de Bax/Bcl-2. (Wang et al., 2015). El estrés oxidativo en la cóclea induce daño en el ADN mitocondrial, relacionado con la edad, en los ratones C57BL/6J, y juega un papel fundamental en el inicio de la presbiacusia experimental por medio de mecanismos de apoptosis (Someya et

al., 2009). Este daño se va acumulando con el tiempo y provoca finalmente la disfunción mitocondrial y la acumulación de mutaciones en su ADN, asociadas a los distintos fenotipos de envejecimiento (Yamasoba, et al., 2007; Du, 2015a). Esta relación con la presbiacusia ha sido descrita en varios estudios (Zeng, et al., 2014; Du et al., 2015a), que indican que el daño en el ADN mitocondrial no genera directamente una pérdida auditiva, pero si una predisposición a ella, aumentando la sensibilidad de la cóclea, por ejemplo, al tratamiento con antibióticos aminoglucósidos (Du et al., 2015b).

El estrés oxidativo también puede estar mediado por la acumulación anómala de GLU que, con sus propiedades neurotóxicas, y al no poderse eliminar, induciría el estrés oxidativo, provocando apoptosis sobre las neuronas del ganglio espiral (Du et al., 2015a; Du et al., 2015b).

d) Análisis de la detección inmunohistoquímica de BAX y Bcl-2:

BAX y Bcl-2 son dos marcadores que se utilizan habitualmente para valorar la tasa de células sanas y células apoptóticas en una población determinada. En este sentido, BAX es un marcador clásico de apoptosis por vía intrínseca, mientras que Bcl-2 es un marcador antiapoptótico típico de las células sanas (Nevado et al., 2006). Más aún, Bax/Bak promueven la activación de las caspasas, mientras que Bcl-2 inhibe la activación de las caspasas, capturando proteínas BH3, activadoras de Bak/Bax, previniendo así su activación (Adams, 2003; Falah et al., 2016).

En contraposición, Bak y Bax permeabilizarían también la membrana externa mitocondrial, permitiendo un flujo de salida de proteínas apoptóticas. Bax es predominante en el citosol en células sanas, pero durante la apoptosis sufre un cambio conformacional y se transloca a la membrana mitocondrial externa. Bak presente en esta membrana, forma largos complejos, que se ha observado que pueden permeabilizar la membrana mitocondrial, permitiendo el paso de citocromo C y de moléculas grandes (Adams, 2003).

Como se ha descrito con anterioridad, con la edad se activan las dos vías de apoptosis, la vía intrínseca (mitocondrial y dependiente de Bcl-2-Bax) y la vía extrínseca (dependiente de caspasa 8) en las neuronas del ganglio espiral de los ratones C57BL6J. Este hecho se ha corroborado en diversos experimentos, al encontrar fragmentación del DNA tanto en células ciliadas como neuronas del ganglio espiral (Frisina et al., 2016; Nevado et al., 2006). Además,

se ha demostrado la regulación de la apoptosis por parte de los genes Bak1 y Casp3 durante el desarrollo de la presbiacusia (Yang, et al 2015).

Volviendo a los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, y valorando las dos moléculas de manera conjunta, se observa una clara relación inversa entre el marcaje de los dos anticuerpos, siendo BAX positivo en todas las espiras y todas las edades, pero sin detectarse un patrón en función de la edad, ya que se observa mucho marcaje en los animales jóvenes también (Fig. 55 a 62). Estos hechos, indican que en los ratones C57, esta presbiacusia experimental es un proceso que comienza a edades muy tempranas, pudiéndose detectar apoptosis por ambas vías de activación desde que los animales son jóvenes, existiendo además un mayor grado de muerte celular progresivo en los machos.

Por otra parte, Bcl-2 es un inhibidor de la mayoría de las vías de muerte celular programada, promoviendo la supervivencia celular (Taфра et al., 2014). Si está integrado en la membrana, las células son sanas, localizado en los orgánulos que potencialmente contienen radicales libres, como la mitocondria, el retículo endoplásmico y la membrana nuclear. Además, ha mostrado su potencial anti-apoptótico tanto en experimentos in vivo como in vitro (Hockenbery et al., 1993). Su disminución induce muerte celular programada (Taфра et al., 2014).

En los resultados aquí presentados, y al contrario de lo que cabría esperar, se observó que el marcaje para Bcl-2 es más positivo en el grupo de los machos, tanto tratados como controles y en concreto el animal de 1 mes con tratamiento de GMS presenta un marcaje fuertemente positivo en las tres espiras. Sin embargo, en otros estudios, Bcl-2 se ha detectado en las neuronas del ganglio espiral en ratones C57BL6J jóvenes, disminuyendo su expresión, tanto en la cóclea como en la corteza auditiva, a lo largo de la edad y asociado a una pérdida de CCEs y a una elevación de los umbrales de audición, lo que sugiere su importante papel como protector frente a la pérdida auditiva que se produce por mecanismos de apoptosis durante el envejecimiento (Huang et al., 2016). Hay algunos investigadores, que como en el caso de los resultados obtenidos, indican que Bcl-2 no parece aumentar con la edad (Nevado et al., 2009), reforzando el hecho de que el proceso de envejecimiento del receptor auditivo es progresivo y muy lento, comenzando a una edad muy temprana. De este modo, existiría una apoptosis programada en algunas células, mientras que otras permanecerían sanas para prolongar así la vida útil del sistema sensorial.

Por otra parte, la regulación de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 necesita ser comparada con la tasa de expresión de la proteína Bax, la proapoptótica antagonista de la proteína Bcl-2. En el caso de la presente Memoria, la relación Bax / Bcl-2 favorece a Bax a lo largo del envejecimiento, con un marcaje más positivo sobre todo en los machos tratados a los 9 meses, que junto con el marcaje muy positivo a esta edad de caspasa-3, es un signo sólido para detectar una apoptosis inducida (Schmutzhard et al., 2013). Los animales de 1 mes muy positivos, pueden corresponderse con una mayor afectación por el GMS a esta edad.

Por otro lado, en estudios con ratones C57BL/6J knockout para Bax, se ha detectado una disminución de la muerte celular programada de las neuronas del ganglio espiral coclear (Someya et al., 2009), demostrando que esta proteína es requerida para el desarrollo de la presbiacusia en su manifestación en este modelo experimental.

Además se ha observado que el estrés oxidativo induce la expresión de Bak ya que al añadir antioxidantes, como coenzima Q10, folato o ácido alfa-lipoico a la dieta de roedores presentaban umbrales auditivos más bajos en PEATC y en los productos de distorsión de las otoemisiones acústicas (DPOAE) (Someya et al., 2009; Martínez-Vega et al., 2016). En otros estudios se muestra que la pérdida auditiva en ratones C57BL/6J es dependiente de apoptosis mitocondrial producida por Bak (Dong et al., 2014).

Clásicamente, se aceptaba que Bax y Bak tenían funciones redundantes en el control de la apoptosis mitocondrial y que eran fundamentales para el desarrollo de los distintos tejidos. Sin embargo, otros estudios sugieren que Bak tiene un papel central en la diferenciación de neuronas y que promueve la apoptosis mitocondrial producida por estrés oxidativo actuando por encima de Bax (Someya et al., 2009). Ratones con deficiencia en Bak disminuyen la pérdida de audición con la edad, mientras que el déficit de Bax no lo hace. Bak se incrementa con la edad en la cóclea, pero Bax no (Someya et al., 2009). Otros autores han indicado un aumento significativo en la expresión de la proteína Bax en la cóclea asociada a la edad (Nevado et al., 2006) por lo que parecen tener funciones diferentes en los fenómenos de apoptosis en la cóclea del adulto, pero aun no está claro cuáles son.

e) Análisis de la detección inmunohistoquímica de enolasa neuronal específica (NSE):

La presencia de enolasa (NSE) en el citoplasma de neuronas maduras se ha identificado en el SNP y en los sistemas sensoriales, mediante técnicas inmunocitoquímicas (Iwanaga et

al., 1989; Yoshie et al., 1989). También, la NSE se ha empleado desde hace décadas en el diagnóstico y detección de tumores neuroendocrinos (Reifenberger et al., 1987), ya que al ser una enzima imprescindible en el metabolismo de la glucólisis, indica el estado metabólico y por tanto de activación que puede presentar la célula. En el caso del receptor auditivo, también se ha utilizado para el marcaje específico y cuantificación de neuronas tipo I en el ganglio espiral coclear (Anniko et al., 1995) y en el ganglio estatoacústico del pollo (Cohen y Love, 1993).

Tras el tratamiento con GMS y en animales con envejecimiento acelerado del receptor auditivo, cabría esperar, como así es, una disminución de NSE, sin embargo, el marcaje obtenido en el presente estudio, indica un aumento proporcionalmente más abundante en la espira apical de los animales tratados con GMS, tanto en hembras como en machos (Fig. 63 a 66). Estos efectos, estarían indicando una posible activación de las neuronas del ganglio espiral, que se produciría al administrar GMS, sobre todo en los grupos de edad comprendidos entre los 3-9 meses en los machos y 3-12 meses en las hembras. Edades en las que las neuronas más afectadas podrían desarrollar mayor actividad como mecanismo de supervivencia, al aumentar la concentración de GLU en la sinapsis entre la CCI y la neurona tipo I.

f) Análisis de la detección inmunohistoquímica de neurofilamentos 200kDa:

Este anticuerpo detecta específicamente los neurofilamentos de 200kDa del citoesqueleto de las neuronas tipo II del ganglio espiral y se ha utilizado esporádicamente para poner de manifiesto su presencia en muestras histológicas de cóclea (Berglund y Ryugo, 1986; 1991; Romand et al., 1990; Anniko et al., 1995).

De manera general, en los animales control prácticamente no se observa marcaje de las fibras ni de los somas de las neuronas tipo II, mientras que en el caso de los animales tratados con GMS existe un marcaje muy evidente, sobretodo de las fibras de estas neuronas, tanto del axón como de las dendritas aunque, en algunos casos, se observan algunos somas neuronales marcados también (Fig. 67 a 71).

Si, como se ha indicado, este anticuerpo marca de manera específica las neuronas tipo II detectando su neurofilamento específico, *a priori* deberían marcarse todas las neuronas tipo II en todas las muestras. Pero varios autores han determinado que las neuronas tipo II del ganglio espiral son difíciles de detectar porque representan solo el 5-10% del total de la población del ganglio (Spoendlin, 1972; Ruggero et al., 1982), y en algunos casos esta detec-

ción se complica aún más solo pudiéndose detectar aquellos neurofilamentos de 200kDa que estén en un estado desfosforilado ([Berglund y Ryugo, 1986](#)).

En los animales control, el marcaje es más intenso en los machos, más aun a 3 y 6 meses de edad y en mayor medida en la espira apical y medial, mientras que en las hembras control no se detectan casi neuronas marcadas y los positivos son homogéneos para todas las espiras y edades, salvo a los 12 meses, en los que el marcaje es muy evidente. Estos datos sugieren, que como en los casos anteriores, existe un dimorfismo sexual en el ratón C57BL6J, y en particular que los machos a la edad de 3-6 meses están sufriendo algún tipo de cambio en sus neuronas tipo II, debido posiblemente a la incipiente prebiacusia que presentan ya a estas edades ([Frisina et al., 2011](#)), mientras que en las hembras, este efecto tiene lugar una vez termina su edad fértil, a los 12 meses.

Tanto las hembras como los machos tratados con GMS tienen un marcaje muy positivo prácticamente en todas las espiras y a todas las edades. Tal y como se ha descrito previamente también, el neurotransmisor liberado por la CCE a la sinapsis con la dendrita de la neurona tipo II, es GLU, modulado por ATP ([Weisz et al., 2009, 2012, 2014](#); [Liu et al., 2015](#)). Pero al comparar esta sinapsis con las neuronas tipo I, las tipo II presentan muy baja actividad ([Eybalin, 1993](#)) y cuando se les administran agonistas glutamatérgicos, como AMPA o AK, las fibras aferentes de tipo-II no manifiestan ningún cambio, mientras que las de tipo-I presentan los típicos daños neurotóxicos del tratamiento ([Pujol et al., 1985](#); [Jenison et al., 1986](#); [Juiz et al., 1989](#); [Gil-Loyzaga y Pujol, 1990](#); [Puel et al., 1991a](#); [1991b](#); [Pujol et al., 1992](#); [Gil-Loyzaga et al., 1993a](#); [1999](#)).

La gran longitud de la dendrita de tipo-II, el número de CCEs contactadas y la lenta liberación de GLU por parte de las CCEs podrían ser los principales factores que explicarían la baja actividad de estas neuronas comparadas con las de tipo-I ([Weisz et al., 2014](#)). Sin embargo, la administración de GMS exógeno en este estudio, ha evidenciado cambios en estas neuronas.

Por otro lado, el ruido intenso, además de producir excitotoxicidad en las neuronas de tipo-I, daña el órgano de Corti, sobre todo las CCEs ([Lieberman y Kiang, 1978](#)), pero, en contraposición, no existen neuronas nociceptoras que inerven este epitelio neurosensorial.

La mayor parte de las neuronas que lo inervan reciben la señal de activación de la CCI, las neuronas tipo I, pero desconocemos la función real del resto, de las neuronas tipo II. Aunque, se ha descrito que la detección de daño tisular inducido por el ruido, posiblemente se produce por las neuronas de tipo II, con lo que representaría la sensación de nocicepción auditiva (Flores et al., 2015; Liu et al., 2015). O en otro caso, podrían ser indicadores del estado del órgano de Corti y de una posible sobreactivación del sistema auditivo, producido por un exceso de estímulo correlacionado con el aumento de GLU producido por el tratamiento.

En el caso de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, sin poder aseverar esa función nociceptiva, descrita en otros estudios, de las neuronas aferentes de tipo II del ganglio espiral, sí se puede indicar, dada la detección de la expresión de los neurofilamentos 200kD en las cócleas de animales tratados con GMS, que el tratamiento ha provocado un cambio de estas neuronas que podría ser la señal de nocicepción comentada anteriormente.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. El modelo experimental de estudio del envejecimiento del sistema auditivo basado en el ratón C57BL6J es un modelo válido que a los 9 meses de edad, exhibe ya las características típicas de la sordera debida al envejecimiento, con lo que es adecuado para el estudio planteado en la presente Tesis Doctoral.
2. La administración intraperitoneal de GMS durante dos días consecutivos produjo los efectos característicos de un proceso excitotóxico en el sistema auditivo de los animales de experimentación, con alteraciones en las ondas de los PEATC registrados y pérdida de neuronas en el ganglio espiral, con mayor afectación en los animales de más edad.
3. Los efectos de la administración de GMS han confirmado una afectación diferencial ligada al sexo, de manera que el tratamiento con GMS no solo no parece afectar tanto a las hembras como a los machos, sino que en algunos casos parecen presentar mayor activación, con un aumento de amplitud y una disminución de la latencia de las ondas del PEATC.
4. Las hembras responden de manera distinta al tratamiento con GMS en función de la fase del ciclo estral en la que se encuentren, siendo los efectos producidos por el GMS en los PEATC, prácticamente opuestos, posiblemente debido al efecto de los niveles de estrógenos y la progesterona.
5. Según estos resultados, las hembras están protegidas por hormonas. De hecho, están protegidas por los estrógenos hasta la menopausia y a partir de ese punto disminuye bruscamente su capacidad auditiva demostrada con la pérdida brusca de neuronas en el ganglio espiral y las alteraciones de los PEATC registrados similares a las de los machos.
6. No todos los efectos funcionales derivados de la administración de GMS pueden discriminarse en los registros de los PEATC ya que el sistema de inervación aferente coclear compensa las alteraciones funcionales e, incluso, la pérdida de dendritas al ser un sistema redundante en el que hay muchas fibras de tipo-I que inervan una sola CCI del órgano de Corti.
7. La afectación morfológica, aunque se ha observado que en hembras a partir de los 9 meses es mucho mayor y más brusca que en los machos, estos se ven afectados de forma más homogénea y progresiva en todas las edades.

8. En los machos, el tratamiento con GMS, disminuye la amplitud y aumenta la latencia con la edad. De hecho, envejecen de manera progresiva y precozmente ya que desde los 3 meses ya hay pruebas de la existencia de apoptosis en las neuronas del ganglio.
9. La presbiacusia se produciría fundamentalmente por apoptosis programada via mitocondrial porque parece haber mecanismos de control del GMS que modulan la respuesta desde las vías centrales. Hay efectos de la vía extrínseca, pero muy pocos.
10. El COS y en concreto el CT, es la estructura que parece verse más afectada por el tratamiento con GMS. Se observa la presencia de edemas en el sistema que, implicando a las neuronas glutamatérgicas, podría afectar también al sistema de neuromodulación eferente coclear.
11. El tratamiento con GMS hace que las neuronas aferentes de tipo-II del ganglio espiral coclear cambien la conformación de sus neurofilamentos de 200kD del citoesqueleto. Este hecho podría estar en relación con la funcionalidad recientemente descrita, de estas neuronas como nociceptores que detectarían condiciones lesivas para el órgano de Corti.
12. El tratamiento con GMS afecta más a los animales más viejos, reforzando la bondad de la hipótesis de partida de la presente Tesis Doctoral y también porque, posiblemente, se exacerbe este efecto dado que las vías centrales, también envejecidas dejan de modular la activación glutamatérgica de las neuronas del ganglio espiral.

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams JM. 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 17(20):2481-95.
- Afanas'ev I. 2010. Signaling and Damaging Functions of Free Radicals in Aging-Free Radical Theory, Hormesis, and TOR. *Aging Dis.* 1(2):75-88.
- Agrawal Y, Platz EA, Niparko JK. 2008. Prevalence of hearing loss and differences by demographic characteristics among US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2004. *Arch Intern Med.* 168(14):1522-30.
- Allen AR, Starr A. 1978. Auditory brain stem potentials in monkey (*M. mulatta*) and man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 45(1):53-63.
- Al-Mana D, Ceranic B, Djahanbakhch O, Luxon LM. 2008. Hormones and the auditory system: a review of physiology and pathophysiology. *Neuroscience.* 153(4):881-900.
- Al-Mana D, Ceranic B, Djahanbakhch O, Luxon LM. 2010. Alteration in auditory function during the ovarian cycle. *Hear Res.* 268(1-2):114-22.
- Altschuler RA, Sheridan CE, Horn JW, Wenthold RJ. 1989. Immunocytochemical localization of glutamate immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 42:167-173.
- Álvarez de Cózar F. 2013. Presbiacusia: Introducción. Definición. En: Libro blanco sobre la presbiacusia. Centro de Estudios e Investigación de GAES. pp: 8-9.
- Angeli SI, Bared A, Ouyang X, Du LL, Yan D, Zhong Liu X. 2012. Audioprofiles and antioxidant enzyme genotypes in presbycusis. *Laryngoscope.* 122(11):2539-42.
- Anniko M, Arnold W, Stigbrand T, Ström A. 1995. The human spiral ganglion. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 57(2):68-77.
- Bared A, Ouyang X, Angeli S, Du LL, Hoang K, Yan D, Liu XZ. 2010. Antioxidant enzymes, presbycusis, and ethnic variability. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 143(2):263-8.
- Baulieu EE. 1998. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 23(8):963-87.
- Bartolomé MV, López LM, Gil-Loyzaga P. 2001. Galectine-1 expression in cochleae of C57BL/6 mice during aging. *Neuroreport.* 12(14):3107-10.
- Bartolomé MV, del Castillo E, López LM, Carricondo F, Poch-Broto J, Gil-Loyzaga P. 2002. Effects of aging on C57BL/6J mice: an electrophysiological and morphological study. *Adv Otorhinolaryngol.* 59:106-11.
- Bartolome MV, Zuluaga P, Carricondo F, Gil-Loyzaga P. 2009. Immunocytochemical detection of synaptophysin in C57BL/6 mice cochlea during aging process. *Brain Res Rev.* 60(2):341-8.
- Berglund AM, Ryugo DK. 1986. A monoclonal antibody labels type II neurons of the spiral ganglion. *Brain Res.* 383(1-2):327-32.
- Berglund AM, Ryugo DK. 1991. Neurofilament antibodies and spiral ganglion neurons of the mammalian cochlea. *J Comp Neurol.* 306(3):393-408.

- Bobbin RP. 1979. Glutamate and aspartate mimic the afferent transmitter in the cochlea. *Exp Brain Res* 34:389-393.
- Böttger EC, Schacht J. 2013. The mitochondrion: a perpetrator of acquired hearing loss. *Hear Res.* 303:12-9.
- Bowl MR, Dawson SJ. 2015. The mouse as a model for age-related hearing loss - a mini-review. *Gerontology.* 61(2):149-57.
- Caligioni CS. 2009. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci.* Appendix 4:Appendix 4I.
- Carlsson PI, Van Laer L, Borg E, Bondeson ML, Thys M, Fransen E, Van Camp G. 2005. The influence of genetic variation in oxidative stress genes on human noise susceptibility. *Hear Res.* 202(1-2):87-96.
- Carricondo F. 2000. El receptor auditivo de la rata adulta y en desarrollo. Estudio electrofisiológico de lesiones neurotóxicas y ototóxicas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Carricondo F, Bartolomé MV, Vicente-Torres MA, Fernández-Pacheco P, Rodríguez T, Gil-Loyzaga P. 2002. Sensitivity to glutamate neurotoxicity in different developmental periods of the rat cochlea. *Adv Otorhinolaryngol.* 59:91-5.
- Carricondo F, Gil-Loyzaga P, Sanjuán-Juaristi J, Poch-Broto J. 2001. Cochlear microphonic potentials: a new recording technique. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 110(6):565-73.
- Carricondo F, Romero-Gómez B. 2017. The cochlear spiral ganglion neurons: the auditory portion of the VIII nerve. *Anat Rec (aceptado)*
- Carricondo F, Romero-Gómez B, Iglesias Moreno MC, Poch-Broto J. 2014. Anatomía funcional del oído interno y vía auditiva. Fenómenos mecánicos y bioeléctricos endococleares. Transmisión del influjo nervioso auditivo. Fisiología de las áreas auditivas corticales y subcorticales. En: Audiología. Ponencia Oficial De la SEORL y PCF. Manrique Rodríguez M. y Marco Algarra J. (Eds.). Ed. CYAN proyectos editoriales. pp: 25-42.
- Caspary DM, Llano DA. 2016. Auditory thalamic circuits and GABA(A) receptor function: Putative mechanisms in tinnitus pathology. *Hear Res.* pii: S0378-5955(16)30213-1.
- Castillo Serrano E. 2003. Presbiacusia Experimental. Efectos del envejecimiento sobre el receptor y la vía auditiva. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Castillo E, Carricondo F, Bartolomé MV, Vicente-Torres A, Poch Broto J, Gil-Loyzaga P. 2006. Presbiacusia: degeneración neuronal y envejecimiento en el receptor auditivo del ratón C57/BL6J. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 57:383-387.
- Ciges, M, Fernández F, Cortés R. 1999. Presbiacusia. En: Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. Suárez C, Gil-Carcedo LM, Marco J, Medina JE, Ortega P, Trinidad J. (Eds). Editorial Proyectos médicos (Madrid). pp: 1395-1405.
- Charitidi K, Meltser I, Tahera Y, Canlon B. 2009. Functional responses of estrogen receptors in the male and female auditory system. *Hear Res.* 252(1-2):71-8.
- Choi DW, Rothman SM. 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxicischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:171-182.
- Cohen GM, Love JE. 1993. Neuronal types in the chicken's statoacoustic ganglion. *Physiologist.* 36(1 Suppl):S77-8
- Coleman JR, Campbell D, Cooper WA, Welsh MG, Moyer J. 1994. Auditory brainstem responses after ovariectomy and estrogen replacement in rat. *Hear Res* 80:209-15.

- Cooper WA, Ross KC, Coleman JR. 1999. Estrogen treatment and age effects on auditory brainstem responses in the post-breeding Long-Evans rat. *Audiology*.38(1):7-12.
- Corti A. 1851. Recherches sur l'organe de l'ouïe des mammifères. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie von Siebold und Kolliker* Bd III.
- Davis H. 1983. An active process in cochlear mechanics. *Hear Res*. 9(1):79-90.
- Dong Y, Li M, Liu P, Song H, Zhao Y, Shi J. 2014. Genes involved in immunity and apoptosis are associated with human presbycusis based on microarray analysis. *Acta Otolaryngol*. 134(6):601-8.
- Du Z, Li S, Liu L, Yang Q, Zhang H, Gao C. 2015a. NADPH oxidase 3-associated oxidative stress and caspase 3-dependent apoptosis in the cochleae of D-galactose-induced aged rats. *Mol Med Rep*. 12(6):7883-90.
- Du Z, Yang Q, Liu L, Li S, Zhao J, Hu J, Liu C, Qian D, Gao C. 2015b. NADPH oxidase 2-dependent oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in the ventral cochlear nucleus of D-galactose-induced aging rats. *Neuroscience*. 286:281-92.
- Emanuele MA, Wezeman F, Emanuele NV. 2002. Alcohol's effects on female reproductive function. *Alcohol Res Health*. 26(4):274-81.
- Eybalin M. 1993. Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev*. 73(2):309-73.
- Eybalin M, Pujol R. 1983. A radioautographic study of [3H]L-glutamate and [3H]L-glutamine uptake in the guinea-pig cochlea. *Neuroscience* 9:863-871.
- Eybalin M, Norenberg MD, Renard N. 1996. Glutamine synthetase and glutamate metabolism in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 101:93-101.
- Falah M, Najafi M, Houshmand M, Farhadi M. 2016. Expression levels of the BAK1 and BCL2 genes highlight the role of apoptosis in age-related hearing impairment. *Clin Interv Aging*. 11:1003-8.
- Ferré Rey J, Morelló-Castro G, Barberá Curto JL. 2002. Factores de riesgo involucrados en la presbiacusia. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 53(8):572-7.
- Flores EN, Duggan A, Madathany T, Hogan AK, Márquez FG, Kumar G, Seal RP, Edwards RH, Liberman MC, García-Añoveros J. 2015. A non-canonical pathway from cochlea to brain signals tissue-damaging noise. *Curr Biol*. 25(5):606-12.
- Friedman RA, Van Laer L, Huentelman MJ, Sheth SS, Van Eyken E, Corneveaux JJ, Tembe WD, Halperin RF, Thorburn AQ, Thys S, Bonneux S, Fransen E, Huyghe J, Pyykkö I, Cremers CW, Kremer H, Dhooge I, Stephens D, Orzan E, Pfister M, Bille M, Parving A, Sorri M, Van de Heyning PH, Makmura L, Ohmen JD, Linthicum FH Jr, Fayad JN, Pearson JV, Craig DW, Stephan DA, Van Camp G. 2009. GRM7 variants confer susceptibility to age-related hearing impairment. *Hum Mol Genet*.. 18(4):785-96.
- Frisina RD, Frisina DR. 2013. Physiological and neurobiological bases of age-related hearing loss: biotherapeutic implications. *Am J Audiol*. 22(2):299-302.
- Frisina RD, Ding B, Zhu X, Walton JP. 2016. Age-related hearing loss: prevention of threshold declines, cell loss and apoptosis in spiral ganglion neurons. *Aging (Albany NY)*. 23;8(9):2081-2099..

- Frisina RD, Singh A, Bak M, Bozorg S, Seth R, Zhu X. 2011. F1 (CBA×C57) mice show superior hearing in old age relative to their parental strains: hybrid vigor or a new animal model for «golden ears»? *Neurobiol Aging*.32(9):1716-24.
- Follesa P, Concas A, Porcu P, Sanna E, Serra M, Mostallino MC, Purdy RH, Biggio G. 2001. Role of allopregnanolone in regulation of GABA(A) receptor plasticity during long-term exposure to and withdrawal from progesterone. *Brain Res Brain Res Rev.* 37(1-3):81-90. Review.
- Fuente A. 2015. The olivocochlear system and protection from acoustic trauma: a mini literature review. *Front Syst Neurosci.* 9:94.
- Gabory A, Attig L, Junien C. 2009. Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. *Mol Cell Endocrinol.* 304(1-2):8-18.
- Genazzani AR, Stomati M, Morittu A, Bernardi F, Monteleone P, Casarosa E, Gallo R, Salvestroni C, Luisi M. 2000. Progesterone, progestagens and the central nervous system. *Hum Reprod.* 15 Suppl 1:14-27.
- Gil-Carcedo LM. 2011. *Otología*. Editorial Médica Panamericana.
- Gil-Carcedo LM, Vallejo LA, y Gil-Carcedo E. 1999. Sobreestimulación acústica. Enfermedades producidas por el ruido. En: *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*. Suárez C, Gil-Carcedo LM, Marco J, Medina JE, Ortega P, Trinidad J. (Eds). Editorial Proyectos Médicos (Madrid). pp: 1378-1395.
- Gil-Loyzaga P. 1995. Neurotransmitters of the olivo-cochlear lateral efferent system: with an emphasis on dopamine. *Acta Otolaryngol (Stockh.)* 115:222-6.
- Gil-Loyzaga P. 1997a. Histochemistry of glycoconjugates of the auditory receptor. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. Gustav Fischer Verlag (Stuttgart-Jena-Lübeck-Ulm) 32/1
- Gil-Loyzaga P. 1997b. Inervación de la cóclea y los núcleos cocleares. *An Real Acad Med Cir.* 114: 1063-89.
- Gil-Loyzaga P. 1999. Regeneración de los receptores del oído interno. En: *Otorrinolaringología*. Suárez Nieto C (Ed.). Ed. Saned. pp: 82-96.
- Gil-Loyzaga P. 2005. Estructura y función de la corteza auditiva. Bases de la vía auditiva ascendente. En: *Tratado de Audiología*. Salesa E, Perelló E, Bonavida A (Eds.). Elsevier España. pp: 23-38.
- Gil-Loyzaga P. 2007. Neuroplasticidad y Sistema Auditivo. En: *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*. Suárez C, Gil-Carcedo LM, Marco J, Medina JE, Ortega P, Trinidad J. (Eds.). 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Madrid, pp:1057-66.
- Gil-Loyzaga P. 2009. Neurotransmitters and neuroplasticity during cochlear development: in vivo and in vitro studies. *Audiological Medicine* 7:11-21.
- Gil-Loyzaga P, Bartolomé MV, Vicente-Torres MA. 1997. Serotonergic innervation of the organ of Corti of the cat cochlea. *Neuroreport* 8:3519-3522.
- Gil-Loyzaga P, Bartolome V, Vicente-Torres A, Carricondo F. 2000. Serotonergic innervation of the organ of corti. *Acta Otolaryngol.* 120(2):128-32.
- Gil-Loyzaga P, Bartolomé MV, Vicente-Torres MA. 1997. Serotonergic innervation of the organ of Corti of the cat cochlea. *Neuroreport* 8:3519-3522.

- Gil Loyzaga P, Carricondo F. 2013. Presbiacusia: envejecimiento de la vía auditiva central. En: Libro blanco sobre la presbiacusia. Centro de Estudios e Investigación de GAES. pp:28-41.
- Gil-Loyzaga P, Cupo A, Eybalin M. 1988. Met-enkephalin and Metenkephalin- Arg6-Gly7-Leu8 immunofluorescence in the developing guinea-pig organ of Corti. Brain Res 470:142-145.
- Gil-Loyzaga P, Fernández-Mateos P, Vicente-Torres MA, Remezal M, Cousillas H, Arce A, Esquifino A. 1993b. Effects of noise stimulation on cochlear dopamine metabolism. Brain Res 623:177-180.
- Gil-Loyzaga P, Hernández-Ortiz MJ, Rodríguez-Benito T, Lasso de la Vega ML. 1993a. Diltiazem protects against neurotoxicity induced by excitotoxic amino acids on cochlear afferent fibers. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 55(4):211-5.
- Gil-Loyzaga P, Parés-Herbuté N. 1989. HPLC detection of dopamine and noradrenaline in the cochlea of adult and developing rats. Dev Brain Res. 48:157-60.
- Gil-Loyzaga P, Poch Broto J. 2007a. El oído interno: Anatomía e Histología de la Cóclea. En: Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. Suárez C, Gil-Carcedo LM, Marco J, Medina JE, Ortega P, Trinidad J. (Eds.). 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Madrid, pp:867-79.
- Gil-Loyzaga P, Poch Broto J. 2007b. Fisiología del Sistema Auditivo Periférico. En: Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. Suárez C, Gil-Carcedo LM, Marco J, Medina JE, Ortega P, Trinidad J. (Eds.). 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Madrid, pp:953-69.
- Gil-Loyzaga P, Pujol R. 1990. Neurotoxicity of kainic acid in the rat cochlea during early developmental stages. Eur Arch Otorhinolaryngol 248:40-48.
- Gil-Loyzaga P, Pujol R. 2010. Fisiología del receptor y la vía auditiva. En: Fisiología Humana. Tresguerres JAF (Ed.). 4ª Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana de España S.L. pp: 227-38.
- Gil-Loyzaga P, Rodríguez Gómez F, Poch Broto J. 2005. Anatomía y fisiología clínicas del oído. En: Otorrinolaringología y Patología Cervicofacial. Poch Broto J (Ed.). Editorial Panamericana, Madrid, pp:1-18.
- Gil-Loyzaga P, Vicente-Torres MA, Fernández-Mateos P, Arce A, Esquifino A. 1994. Piribedil affects dopamine turnover in cochleas stimulated by white noise. Hear Res. 79(1-2):178-82.
- Godfrey DA, Carter JA, Berger SJ, Matschinsky FM. 1976. Levels of putative transmitter amino acids in the guinea pig cochlea. J Histochem Cytochem 24:468-470.
- Gómez Serrano M, López Farré A, Carricondo Orejana FJ, Iglesias Moreno MC, Rodríguez Sierra P, Romero Gómez B, López Salcedo A, Poch-Broto J. 2016. Bases moleculares de las sorderas de origen genético. En: La sordera neurosensorial. De las bases moleculares a la clínica. Ramírez-Camacho R. (Ed.) Springer Healthcare Communications Ibérica. pp:15-28.
- Gratton MA, Schulte BA, Smythe NM. 1997. Quantification of the stria vascularis and strial capillary areas in quiet-reared young and aged gerbils. Hear Res. 114(1-2):1-9.
- Han X, Ge R, Xie G, Li P, Zhao X, Gao L, Zhang H, Wang O, Huang F, Han F. 2015. Caspase-mediated apoptosis in the cochleae contributes to the early onset of hearing loss in A/J mice. ASN Neuro. 7(1).

- Hasson D, Theorell T, Bergquist J, Canlon B. 2013. Acute stress induces hyperacusis in women with high levels of emotional exhaustion. *PLoS One*. 8(1):e52945.
- Harrison JM, Feldman ML. 1970. Anatomical aspects of the cochlear nucleus and superior olivary complex. En: *Contributions to sensory physiology*. Neff WD (Ed.). Academic Press, New York. 1970. Vol 4, pp: 95-143.
- Harrison JM, Irving R. 1965. The anterior ventral cochlear nucleus. *J Comp Neurol*. 124:15-41.
- Hawkins JE Jr. 1973. Comparative otopathology: aging, noise, and ototoxic drugs. *Adv Otorhinolaryngol*. 20:125-41.
- Hederstierna C, Hultcrantz M, Collins A, Rosenhall U. 2010. The menopause triggers hearing decline in healthy women. *Hear Res*. 259:31-5.
- Helmholtz H. 1895. *On the sensations of tone as a physiological basis for the theory of music*. London, New York: Longmans, Green, and Co.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*. 75(2):241-51.
- Huang Q, Xiong H, Yang H, Ou Y, Zhang Z, Chen S, Ye Y, Zheng Y. 2016. Differential Expression of Bcl-2 in the Cochlea and Auditory Cortex of a Mouse Model of Age-Related Hearing Loss. *Audiol Neurotol*. 21(5):326-32.
- Hultcrantz M, Simonoska R, Stenberg AE. 2006. Estrogen and hearing: a summary of recent investigations. *Acta Otolaryngol*. 126(1):10-4.
- Hunter KP, Willott JE. 1987. Aging and the auditory brainstem response in mice with severe or minimal presbycusis. *Hear Res*. 30(2-3):207-18.
- Iwanaga T, Takahashi Y, Fujita T. 1989. Immunohistochemistry of neuron-specific and glia-specific proteins. *Arch Histol Cytol*. 52 Suppl:13-24. Review.
- Jenison GL, Winbery S, Bobbin RP. 1986. Comparative actions of quisqualate and N-methyl-D-aspartate, excitatory amino acid agonists, on guinea-pig cochlear potentials. *Comp Biochem Physiol C*. 84(2):385-9.
- Jerger J, Hall J. 1980. Effects of age and sex on auditory brainstem response. *Arch Otolaryngol*. 106(7):387-91.
- Jethava A, Dasanu CA. 2012. Acute Wernicke encephalopathy and sensorineural hearing loss complicating bariatric surgery. *Conn Med*. 76(10):603-5.
- Johnsson LG, Hawkins JE Jr. 1972. Sensory and neural degeneration with aging, as seen in microdissections of the human inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 81(2):179-93.
- Johnson JW, Ascher P. 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325:529-531.
- Jones N, Fex J, Altschuler RA. 1987. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity identifies possible catecholaminergic fibers in the organ of Corti. *Hear Res*. 30(1):33-8.
- Juiz JM, Rueda J, Merchán JA, Sala ML. 1989. The effects of kainic acid on the cochlear ganglion of the rat. *Hear Res*. 40(1-2):65-74.
- Katzenellenbogen BS. 2000. Mechanisms of action and cross-talk between estrogen receptor and progesterone receptor pathways. *J Soc Gynecol Investig*. 7(1 Suppl):S33-7.

- Kilicdag EB, Yavuz H, Bagis T, Tarim E, Erkan AN, Kazanci F. 2004. Effects of estrogen therapy on hearing in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol.* 190(1):77-82
- Kim SH, Kang BM, Chae HD, Kim CH. 2002. The association between serum estradiol level and hearing sensitivity in postmenopausal women. *Obstet Gynecol.* 99(5 Pt 1):726-30.
- Kopke R, Allen KA, Henderson D, Hoffer M, Frenz D, Van de Water T. 1999. A radical demise. Toxins and trauma share common pathways in hair cell death. *Ann N Y Acad Sci.* 884:171-91.
- Knipper M, Köpschall I, Rohbock K, Köpke AK, Bonk I, Zimmermann U, Zenner H. 1997. Transient expression of NMDA receptors during rearrangement of AMPA-receptor-expressing fibers in the developing inner ear. *Cell Tissue Res.* 287(1):23-41.
- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lütjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C, Jentsch TJ. 1999. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell.* 96(3):437-46.
- Kujawa SG, Liberman MC. 2009. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after «temporary» noise-induced hearing loss. *J Neurosci.* 11;29(45):14077-85.
- Lamdhade S, Almulla A, Alroughani R. 2014. Recurrent Wernicke's Encephalopathy in a 16-Year-Old Girl with Atypical Clinical and Radiological Features. *Case Rep Neurol Med.* 2014:582482.
- Laugel GR, Dengerink HA, Wright JW. 1987. Ovarian steroid and vasoconstrictor effects on cochlear blood flow. *Hear Res.* 31(3):245-51.
- Lee JH, Marcus DC. 2001. Estrogen acutely inhibits ion transport by isolated stria vascularis. *Hear Res.* 158(1-2):123-30.
- Liu C, Glowatzki E, Fuchs PA. 2015. Unmyelinated type-II afferent neurons report cochlear damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:14723-14727.
- Lombardi G, Zarrilli S, Colao A, Paesano L, Di Somma C, Rossi F, De Rosa M. 2001. Estrogens and health in males. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;178(1-2):51-5.
- Lorente de No R. 1933. Anatomy of the eight nerve. General plan of structure of the primary cochlear nuclei. *Laryngoscope* 43:327-350.
- Lorente de No R. 1981. *The Primary Acoustic Nuclei.* New York, Raven Press.
- Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J, Isner JM. 1994. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation.* 89(4):1501-10.
- Luo H, Yang T, Jin X, Pang X, Li J, Chai Y, Li L, Zhang Y, Zhang L, Zhang Z, Wu W, Zhang Q, Hu X, Sun J, Jiang X, Fan Z, Huang Z, Wu H. 2013. Association of GRM7 variants with different phenotype patterns of age-related hearing impairment in an elderly male Han Chinese population. *PLoS One.* 8(10):e77153.
- Maestre L. 2002. Estudio experimental de los efectos del envejecimiento en el receptor auditivo. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Martínez-Vega R, Murillo-Cuesta S, Partearroyo T, Varela-Moreiras G, Varela-Nieto I, Pajares MA. 2016. Long-Term Dietary Folate Deficiency Accelerates Progressive Hearing Loss on CBA/Ca Mice. *Front Aging Neurosci.* 8:209.

- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. 1984. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261-263.
- McCullar JS, Oesterle EC. 2009. Cellular targets of estrogen signaling in regeneration of inner ear sensory epithelia. *Hear Res.* 252(1-2):61-70.
- McFadden D. 2000. Masculinizing effects on otoacoustic emissions and auditory evoked potentials in women using oral contraceptives. *Hear Res.* 142(1-2):23-33.
- Merchán Pérez A. 1992. Identificación de neurotransmisores durante el desarrollo del receptor acústico. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Merchán-Pérez A, Gil-Loyzaga P, Bartolomé MV, Remezal M, Fernández P, Rodríguez T. 1999. Decalcification by ascorbic acid for immuno- and affinochemical techniques on the inner ear. *Histochem Cell Biol.* 112(2):125-30.
- Merchan-Perez A, Gil-Loyzaga P, Eybalin M. 1990a. Immunocytochemical detection of calcitonin gene-related peptide in the postnatal developing rat cochlea. *Int J Dev Neurosci* 8:603-612.
- Merchan-Perez A, Gil-Loyzaga P, Eybalin M. 1990b. Ontogeny of glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyric acid immunoreactivities in the rat cochlea. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 248:4-7.
- Merchan-Perez A, Gil-Loyzaga P, Eybalin M. 1990c. Immunocytochemical detection of glutamate decarboxylase in the postnatal developing rat organ of Corti. *Int J Dev Neurosci* 8:613-620.
- Merchán Pérez A, Gil-Loyzaga P, Eybalin M, Fernández Mateos P, Bartolomé MV. 1994. Choline-acetyltransferase-like immunoreactivity in the organ of Corti of the rat during postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res* 82:29-34.
- Merchán-Pérez A, Gil-Loyzaga P, López-Sánchez J, Eybalin M, Valderrama FJ. 1993. Ontogeny of gamma-aminobutyric acid in efferent fibers to the rat cochlea. *Brain Res Dev Brain Res* 76:33-41.
- Motohashi R, Takumida M, Shimizu A, Konomi U, Fujita K, Hirakawa K, Suzuki M, Anniko M. 2010. Effects of age and sex on the expression of estrogen receptor alpha and beta in the mouse inner ear. *Acta Otolaryngol.* 130(2):204-14.
- Nador JB Jr. 2010. Disorders of aging. En: Schuknecht's Pathology of the Ear. Merchant SN, Nadol JB Jr (Eds.) 3ª Edición. People's Medical Publishing House-USA, pp: 432-477.
- Nakagawa T, Komune S, Uemura T, Akaike N. 1991. Excitatory amino acid response in isolated spiral ganglion cells of guinea pig cochlea. *J Neurophysiol* 65:715-723.
- Nevado J, Sanz R, Casqueiro JC, Ayala A, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. 2006. Ageing evokes an intrinsic pro-apoptotic signalling pathway in rat cochlea. *Acta Otolaryngol.* 126(11):1134-9.
- Nicotera TM, Hu BH, Henderson D. 2003. The caspase pathway in noise-induced apoptosis of the chinchilla cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol.* 4(4):466-77.
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 81(4):1535-65.
- Oestreicher E, Wolfgang A, Felix D. 2002. Neurotransmission of the cochlear inner hair cell synapse--implications for inner ear therapy. *Adv Otorhinolaryngol* 59:131-139.

- Ohlemiller KK, Wright JS, Dugan LL. 1999. Early elevation of cochlear reactive oxygen species following noise exposure. *Audiol Neurotol.* 4(5):229-36.
- Olney JW. 1969. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-721.
- Olney JW, Price MT, Samson L, Labruyere J. 1986. The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci Lett* 65:65-71.
- Osen KK. 1969. Cytoarchitecture of the cochlear nuclei in the cat. *J Comp Neurol.* 136(4):453-84.
- Ouda L, Profant O, Syka J. 2015. Age-related changes in the central auditory system. *Cell Tissue Res.* 361(1):337-58.
- Park SN, Back SA, Park KH, Kim DK, Park SY, Oh JH, Park YS, Yeo SW. 2010. Comparison of cochlear morphology and apoptosis in mouse models of presbycusis. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 3(3):126-35.
- Parlee MB. 1983. Menstrual rhythms in sensory processes: a review of fluctuations in vision, olfaction, audition, taste, and touch. *Psychol Bull.* 93(3):539-48.
- Patterson JV, Michalewski HJ, Thompson LW, Bowman TE, Litzelman DK. 1981. Age and sex differences in the human auditory brainstem response. *J Gerontol.* 36(4):455-62.
- Pauw RJ, Huygen PL, Colditz GM, Cremers CW. 2011. Phenotype analysis of an Australian DFNA9 family with the 1109N COCH mutation. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 120(6):414-21.
- Peng BG, Li QX, Ren TY, Ahmad S, Chen SP, Chen P, Lin X. 2004. Group I metabotropic glutamate receptors in spiral ganglion neurons contribute to excitatory neurotransmissions in the cochlea. *Neuroscience* 123:221-230.
- Poch-Broto J. 1983. Intoxicaciones laberínticas por fármacos. En: *El Oído Interno. Ultraestructura, embriogénesis y algunos aspectos patológicos.* Merchán M. (Ed.) Ediciones de la Universidad de Salamanca y de la Universidad de Alicante. pp:135-148.
- Price K, Zhu X, Guimaraes PF, Vasilyeva ON, Frisina RD. 2009. Hormone replacement therapy diminishes hearing in perimenopausal mice. *Hear Res.* 252(1-2):29-36.
- Puel JL, Pujol R, Tribillac F, Ladrech S, Eybalin M. 1994. Excitatory amino acid antagonists protect cochlear auditory neurons from excitotoxicity. *J Comp Neurol.* 341(2):241-56.
- Puel JL. 1995. Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Prog Neurobiol* 47:449-476.
- Puel JL, Ladrech S, Chabert R, Pujol R y Eybalin M. 1991a. Electrophysiological evidence for the presence of NMDA receptors in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 51:255-264.
- Puel JL, Pujol R, Ladrech S, Eybalin M. 1991b. α -amino-3-methyl-4-isoxazole propionic acid electrophysiological and neurotoxic effects in the guinea pig cochlea. *Neurosci* 45: 63-72.
- Pujol R, Lenoir M, Ladrech S, Tribillac F, Rebillard G. 1992. Correlation between the length of outer hair cells and the frequency coding of the cochlea. En: *Auditory Physiology and Perception.* Cazals Y, Demany L, Horner KC (Eds.). Pergamon Press. Oxford. pp:45-52.
- Ramón y Cajal S. 1909. *Histologie du systeme nerveux de l'homme y des vertébrés.* Maloine. 1909.
- Reifenberger G, Szymas J, Wechsler W. 1987. Differential expression of glial- and neuronal-associated antigens in human tumors of the central and peripheral nervous system. *Acta Neuropathol.* 74(2):105-23. Review.

- Robertson D, Mulders WH. 2000. Distribution and possible functional roles of some neuroactive peptides in the mammalian superior olivary complex. *Microsc Res Tech*.51(4):307-17.
- Romand R, Sobkowicz H, Emmerling M, Whitlon D, Dahl D. 1990. Patterns of neurofilament stain in the spiral ganglion of the developing and adult mouse. *Hear Res*.49(1-3):119-25.
- Roth TN, Hanebuth D, Probst R. 2011. Prevalence of age-related hearing loss in Europe: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 268(8):1101-7.
- Rovasio R, Gil-Loyzaga P. 2008. Sistemas sensoriales: Recepción de señales y elaboración de respuestas. En: *Histología y Embriología del ser humano. Bases celulares y moleculares*. Eynard AR, Valentich MA, Rovasio RA. (Eds.) 4ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp:360-393.
- Rozen R. 1997. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost*. 78(1):523-6.
- Ruel J, Wang J, Rebillard G, Eybalin M, Lloyd R, Pujol R, Puel JL. 2007. Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hear Res* 227:19-27.
- Ruel J, Chabbert C, Nouvian R, Bendris R, Eybalin M, Leger CL, Bourien J, Mersel M, Puel JL. 2008. Salicylate enables cochlear arachidonic-acid-sensitive NMDA receptor responses. *J Neurosci*. 28(29):7313-23.
- Ruggero MA, Santi PA, Rich NC. 1982. Type-II cochlear ganglion cells in the chinchilla. *Hear Res* 8:339-356.
- Sanchez JT, Ghelani S, Otto-Meyer S. 2015. From development to disease: diverse functions of NMDA-type glutamate receptors in the lower auditory pathway. *Neurosci*. 285:248-59.
- Sánchez Malmierca M, Merchán Cifuentes MA. 2007. Estructura y función del cerebro auditivo. En: *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*. Suárez C, Gil-Carcedo LM, Marco J, Medina JE, Ortega P, Trinidad J. (Eds.). 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Madrid, pp:969-96.
- Scholtz AW, Kanonier G, Schrott-Fischer A. 1998. Immunohistochemical investigation of enkephalins in the human inner ear. *Hear Res*. 118(1-2):123-8.
- Schmutzhard J, Glueckert R, Pritz C, Blumer MJ, Bitsche M, Lackner P, Fille M, Riechelmann H, Harkamp M, Sitthisak T, Schrott-Fischer A. 2013. Sepsis otopathy: experimental sepsis leads to significant hearing impairment due to apoptosis and glutamate excitotoxicity in murine cochlea. *Dis Model Mech*. 6(3):745-54.
- Schuknecht HF, Gacek MR. 1993. Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 102(1 Pt 2):1-16.
- Schuknecht HF. 1964. Further observations on the pathology of presbycusis. *Arch Otolaryngol*. 80:369-82.
- Schwartz IR, Ryan AF. 1986. Amino acid labeling patterns in the efferent innervation of the cochlea: an electron microscopic autoradiographic study. *J Comp Neurol* 246:500-512.
- Sergeyenko Y, Lall K, Liberman MC, Kujawa SG. 2013. Age-related cochlear synaptopathy: an early-onset contributor to auditory functional decline. *J Neurosci*. 21;33(34):13686-94
- Sharpe RM. 1998. The roles of oestrogen in the male. *Trends Endocrinol Metab*. 9(9):371-7.
- Shaw NA. 1988. The auditory evoked potential in the rat--a review. *Prog Neurobiol*. 31(1):19-45.

- Simón Luis F. 1995. Neurotoxicidad inducida por glutamato monosódico en la cóclea de rata en desarrollo. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Simmons DD, Liberman MC. 1988. Afferent innervation of outer hair cells in adult cats: I. Light microscopic analysis of fibers labeled with horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 270:132-144.
- Sisneros JA, Forlano PM, Deitcher DL, Bass AH. 2004. Steroid-dependent auditory plasticity leads to adaptive coupling of sender and receiver. *Science*. 305(5682):404-7.
- Someya S, Xu J, Kondo K, Ding D, Salvi RJ, Yamasoba T, Rabinovitch PS, Weindrich R, Leeuwenburgh C, Tanokura M, Prolla TA. 2009. Age-related hearing loss in C57BL/6J mice is mediated by Bak-dependent mitochondrial apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(46):19432-7.
- Spoendlin H. 1972. Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol* 73:235-248.
- Stenberg A, Wang H, Sahlin L, Hultcrantz M. 1999. Mapping of estrogen receptors a and b in the inner ear of mouse and rat. *Hear Res*. 136: 29-34.
- Stenberg AE, Wang H, Fish J 3rd, Schrott-Fischer A, Sahlin L, Hultcrantz M. 2001. Estrogen receptors in the normal adult and developing human inner ear and in Turner's syndrome. *Hear Res*. 157(1-2):87-92.
- Tadros SF, D'Souza M, Zhu X, Frisina RD. 2008. Apoptosis-related genes change their expression with age and hearing loss in the mouse cochlea. *Apoptosis*. 13(11):1303-21.
- Tafra R, Brakus SM, Vukojevic K, Kablar B, Colovic Z, Saraga-Babic M. 2014. Interplay of proliferation and proapoptotic and antiapoptotic factors is revealed in the early human inner ear development. *Otol Neurotol*. 35(4):695-703.
- Tang X, Zhu X, Ding B, Walton JP, Frisina RD, Su J. 2014. Age-related hearing loss: GABA, nicotinic acetylcholine and NMDA receptor expression changes in spiral ganglion neurons of the mouse. *Neuroscience*. 259:184-93.
- Thompson SK, Zhu X, Frisina RD. 2006. Estrogen blockade reduces auditory feedback in CBA mice. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 135(1):100-5.
- Tremere LA, Kovaleski RE, Burrows K, Jeong JK, Pinaud R. 2012. Mechanistic basis and functional roles of long-term plasticity in auditory neurons induced by a brain-generated estrogen. *J Neurosci*. 32(46):16478-95.
- Uchida Y, Sugiura S, Sone M, Ueda H, Nakashima T. 2014. Progress and prospects in human genetic research into age-related hearing impairment. *Biomed Res Int*. 2014:390601.
- Usami S, Hozawa J, Tazawa M, Yoshihara T, Igarashi M, Thompson GC. 1988. Immunocytochemical study of catecholaminergic innervation in the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol Suppl*. 447:36-45.
- Van De Water TR, Rybak LP. 2004. Ototoxic damage to hearing: Otoprotective therapies. En: *Ototoxicity*. Roland PS, Rutka JA (Eds.). BC Decker Inc. Hamilton, Ontario. pp: 170-183.
- Vicente-Torres A, Bartolomé MV, Carricondo F, Esquifino A, Gil-Loyzaga P. 1998. HPLC detection of serotonin within the rat cochlea. *Neuroreport* 9:3699-3701.
- Vicente-Torres MA, Gil-Loyzaga P, Fernández P, Arce A, Esquifino A. 1993. Piribedil could modify dopamine turnover in cochleas under noise stimulation. *ORL J Otorhinolaryngol Relat*; 55(6):322-4.

- Vicente-Torres MA, Gil-Loyzaga P. 1999. Noise stimulation decreases the concentration of norepinephrine in the rat cochlea. *Neurosci Lett.* 266(3):217-9.
- Vicente-Torres MA, Muñoz E, Dávila D, Gil-Loyzaga P. 2001. Changes in the cochlear dopaminergic system of the aged rat. *Brain Res.* 917(1):112-7.
- Vicente-Torres MA, Dávila D, Muñoz E, Gil-Loyzaga P. 2002. Effects of aging on cochlear monoamine turnover. *Adv Otorhinolaryngol.* 59:112-5.
- Vortmeyer AO, Colmant HJ. 1988. Differentiation between brain lesions in experimental thiamine deficiency. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 414(1):61-7.
- Wang Y, Chu H, Zhou L, Gao H, Xiong H, Chen Q, Chen J, Huang X, Cui Y. 2012. Correlation of PDCD5 and apoptosis in hair cells and spiral ganglion neurons of different age of C57BL/6J mice. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 32(1):113-8.
- Wang W, Sun Y, Chen S, Zhou X, Wu X, Kong W, Kong W. 2015. Impaired unfolded protein response in the degeneration of cochlea cells in a mouse model of age-related hearing loss. *Exp Gerontol.* 70:61-70.
- Warr WB. 1992. Organization of olivocochlear efferent systems in mammals. En: *The Mammalian Auditory Pathway: Neuroanatomy.* Webster DB, Popper AN, Fay RR. (Eds.). Springer-Verlag, New York. pp:410-48.
- Weber G, Bray C. 1930. The nature of acoustic response. *J Exp Physiol.* 13:373.
- Weisz C, Glowatzki E, Fuchs P. 2009. The postsynaptic function of type-II cochlear afferents. *Nature* 461:1126-1129.
- Weisz CJ, Glowatzki E, Fuchs PA. 2014. Excitability of type-II cochlear afferents. *J Neurosci* 34:2365-2373.
- Weisz CJ, Lehar M, Hiel H, Glowatzki E, Fuchs PA. 2012. Synaptic transfer from outer hair cells to type-II afferent fibers in the rat cochlea. *J Neurosci* 32:9528-9536
- Welsh LW, Welsh JJ, Healy MP. 1985. Central presbycusis. *Laryngoscope.* 95(2):128-36.
- Willott JF, Hnath Chisolm T, Lister JJ. 2001. Modulation of presbycusis: current status and future directions. *Audiol Neurotol.* 6(5):231-49.
- Wong AC, Ryan AF. 2015. Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea. *Front Aging Neurosci.* 7:58.
- Xu DY, Tang YD, Liu SX, Liu J. 2007. Distribution and significance of endothelin 1 in guinea pig cochlear lateral wall. *J Laryngol Otol.* 121(8):721-4.
- Xu D, Tang Y, Liu S, Liu J. 2008. Expression and significance of endothelin 1 in spiral ganglion cells of guinea pig. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 72(2):189-92.
- Xue T, Wei L, Zha DJ, Qiu JH, Chen FQ, Qiao L, Qiu Y. 2016. miR-29b overexpression induces cochlear hair cell apoptosis through the regulation of SIRT1/PGC-1 α signaling: Implications for age-related hearing loss. *Int J Mol Med.* 38(5):1387-94.
- Yamane H, Nakai Y, Takayama M, Iguchi H, Nakagawa T, Kojima A. 1995. Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 252(8):504-8.

- Yamashita D, Jiang HY, Schacht J, Miller JM. 2004. Delayed production of free radicals following noise exposure. *Brain Res.* 1019(1-2):201-9.
- Yamasoba T, Someya S, Yamada C, Weindruch R, Prolla TA, Tanokura M. 2007. Role of mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA mutations in age-related hearing loss. *Hear Res.* 226(1-2):185-93.
- Yamasoba T, Lin FR, Someya S, Kashio A, Sakamoto T, Kondo K. 2013. Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. *Hear Res.* 303:30-8.
- Yang L, Zhang H, Han X, Zhao X, Hu F, Li P, Xie G, Gao L, Cheng L, Song X, Han F. 2015. Attenuation of hearing loss in DBA/2J mice by anti-apoptotic treatment. *Hear Res.* 327:109-16.
- Young ED. 2013. Which neurons survive the glutamate storm? *J Neurophysiol.* 110(3):575-6.
- Yoshie S, Teraki Y, Iwanaga T, Fujita T. 1989. Immunocytochemistry of neuron-specific proteins and neuropeptides in taste buds and associated nerves. *Arch Histol Cytol.* 52 Suppl:389-96.
- Zeng L, Yang Y, Hu Y, Sun Y, Du Z, Xie Z, Zhou T, Kong W. 2014. Age-related decrease in the mitochondrial sirtuin deacetylase Sirt3 expression associated with ROS accumulation in the auditory cortex of the mimetic aging rat model. *PLoS One.* 9(2):e88019.
- Zheng HW, Chen J, Sha SH. 2014. Receptor-interacting protein kinases modulate noise-induced sensory hair cell death. *Cell Death Dis.* 5:e1262.
- Zheng QY, Johnson KR, Erway LC. 1999. Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hear Res.* 130(1-2):94-107.
- Páginas web consultadas
- www.Ototóxicos.com (Feb-2017)
- Instituto Nacional de Estadística (INE) 2015; <http://www.ine.es/jaxi/tabla.do> (Dic-2017)



